

|                                                                                   |                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|
|  | Protocoles                      | Indice 02 |
|                                                                                   | <b>Microscopie électronique</b> |           |

## OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce document décrit les protocoles utilisés sur les plateaux techniques de microscopie électronique de la PF d'imagerie TRI

## SUIVI DES MODIFICATIONS

| Date     | Indice | Nature modification |
|----------|--------|---------------------|
| 15.06.09 | 01     | Création            |
| 25.11.14 | 02     | Rajout protocoles   |
| 06.01.15 |        |                     |
|          |        |                     |

|                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| Rédigé par: <b>S.Balor</b> | Validé par: <b>B.Payré</b> |
|----------------------------|----------------------------|

|                                                                                   |                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
|  | Protocoles               | Indice 02 |
|                                                                                   | Microscopie électronique |           |

## SOMMAIRE

| Protocoles de Microscopie Electronique à Transmission |                                                                                                    |               |                    |  |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|--|
| <b>MET</b> <b>Température ambiante</b>                |                                                                                                    |               |                    |  |
| <b>A-</b>                                             | <b><u>Protocoles étude morphologique</u></b>                                                       | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |  |
|                                                       | <b>1</b> Fixation classique cellules en culture EMBED812/cacodylate                                | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>2</b> Fixation classique cellules en culture EMBED812/cacodylate Version 2 (MET B ex-ref CMEAB) | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>3</b> Fixation classique cellules en culture EMBED812/sorensen (MET C ex-ref CMEAB)             | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>4</b> Fixation morpho Peau Humaine                                                              | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>5</b> fixation Peau Conservation des lipides                                                    | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>6</b> Fixation Morphologique Botanique racines et Nodules                                       | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>7</b> Fixation Morphologique Cerveaux d'abeille                                                 | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>8</b> Fixation de cellules sur lamelle de verre                                                 | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>9</b> Fixation Morphologique des bactéries                                                      | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>10</b> Fixation des tissus - tampon sorensen (MET A ex-ref CMEAB)                               | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>11</b> Fixation des tissus - tampon cacodylate (MET D ex-ref CMEAB)                             | 01            | 2                  |  |
| <b>B-</b>                                             | <b><u>Protocoles immunodétection</u></b>                                                           | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |  |
|                                                       | <b><u>Fixation</u></b>                                                                             |               |                    |  |
|                                                       | <b>1</b> Fixation de cellules en culture pour immunomarquage (MET E ex-ref CMEAB)                  | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>2</b> Fixation Levures pour immunomarquage                                                      | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>3</b> Fixation générale pour cryocoupes et immunomarquage                                       | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b>4</b> Fixation pour cryocoupes et immunomarquage de levures                                     | 01            | 2                  |  |
|                                                       | <b><u>Immuno Marquage Post Embedding</u></b>                                                       |               |                    |  |
|                                                       | <b>5</b> Immunomarquage(MET) Post-inclusion version 1                                              | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>6</b> Immunomarquage(MET) Post-inclusion version 2                                              | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>7</b> Immunomarquage(MET) Post-inclusion version 3                                              | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b><u>Immuno Marquage Pre Embedding</u></b>                                                        |               |                    |  |
|                                                       | <b>8</b> Immunomarquage PreEmbedding selon BBI                                                     | 01            | 1                  |  |
|                                                       | <b>9</b> Immunomarquage Nanogold Pre-Embedding                                                     | 01            | 4                  |  |

|                                                                                   |                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
|  | Protocoles               | Indice 02 |
|                                                                                   | Microscopie électronique |           |

|                                        |                                                                            |               |                    |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| <b>Immuno Marquage sur Cryocoupes</b>  |                                                                            |               |                    |
| <b>10</b>                              | Immunomarquage sur cryocoupes                                              | 01            | 2                  |
| <b>C-</b>                              | <u>Protocoles immunodétection</u>                                          | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
| <b>1</b>                               | Les techniques de coloration négatives et les différents contrastants      | 01            | 3                  |
| <b>D-</b>                              | <u>Contraste des coupes</u>                                                | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
| <b>1</b>                               | Coloration des coupes semi-fines en ME                                     | 01            | 1                  |
| <b>2</b>                               | Contraste des coupes ultrafines                                            | 01            | 1                  |
| <b>MET    Température basse (Cryo)</b> |                                                                            |               |                    |
| <b>E-</b>                              | <u>Cryofixation EM pact</u>                                                | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
| <b>1</b>                               | Protocole de Cryofixation et cryosubstitution levure                       | 01            | 4                  |
| <b>F-</b>                              | <u>CryoSubstitution</u>                                                    | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
| <b>1</b>                               | Protocole de cryosubstitution                                              | 01            | 3                  |
| <b>2</b>                               | Protocole Inclusion à basse température (PLT progressive low température)  | 01            | 1                  |
| <b>3</b>                               | Unicryl sous UV à -20°C après enrobage dans de l'agar (MET F ex-ref CMEAB) | 01            | 2                  |
| <b>G-</b>                              | <u>Cryocoupes</u>                                                          | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
| <b>1</b>                               | Stockage                                                                   | 01            | 3                  |
| <b>2</b>                               | Cryoultramicrotome                                                         | 01            | 1                  |

|                                                          |                                                                      |               |                    |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| <b>Protocoles de Microscopie Electronique à Balayage</b> |                                                                      |               |                    |
| <b>MEB</b>                                               |                                                                      |               |                    |
| <b>A-</b>                                                | <u>Protocoles de préparation à température ambiante</u>              | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
| <b>1</b>                                                 | Préparation de tissus dans le tampon sorensen (MEB A ex-ref CMEAB)   | 01            | 1                  |
| <b>2</b>                                                 | Préparation de tissus dans le tampon cacodylate (MEB B ex-ref CMEAB) | 01            | 1                  |

|                                                                                   |                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
|  | Protocoles               | Indice 02 |
|                                                                                   | Microscopie électronique |           |

|           |                                      |                                                          |               |                    |
|-----------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
|           | <b>3</b>                             | Préparation de coupes de dents (MEB C ex-ref CMEAB)      | 01            | 1                  |
|           | <b>4</b>                             | Préparation de cultures cellulaires (MEB D ex-ref CMEAB) | 01            | 1                  |
| <b>B-</b> | <u>Protocoles de cryopréparation</u> |                                                          | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
|           | <b>1</b>                             | Cryopanning                                              | 01            | 2                  |

| <b>REACTIFS</b> |                                |                                                  |               |                    |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| <b>A-</b>       | <u>Tampons</u>                 |                                                  | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
|                 | <b>1</b>                       | Cacodylate de sodium                             | 01            | 1                  |
|                 | <b>2</b>                       | Sorensen                                         | 01            | 1                  |
|                 | <b>3</b>                       | PIPES                                            | 01            | 1                  |
|                 | <b>4</b>                       | Maleate                                          | 01            | 1                  |
| <b>B-</b>       | <u>Resines</u>                 |                                                  | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
|                 | <b>1</b>                       | Résine Embed 812                                 | 01            | 3                  |
|                 | <b>2</b>                       | Résine Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit | 01            | 4                  |
| <b>C-</b>       | <u>Support Film sur Grille</u> |                                                  | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
|                 | <b>1</b>                       | Formwar                                          | 01            | 1                  |
|                 | <b>2</b>                       | Carbonne                                         | 01            | 1                  |
|                 | <b>3</b>                       | Collodion                                        | 01            | 1                  |
| <b>D-</b>       | <u>Contrastant</u>             |                                                  | <b>Indice</b> | <b>Nb de pages</b> |
|                 | <b>1</b>                       | Préparation Citrate de Plomb selon Reynolds      | 01            | 1                  |

|                                                                                   |                                                                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                                       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation classique de cellules en culture<br/>Embed812/cacodylate</b> | MET A 1   |

#### a) Fixation au glutaraldéhyde

- Enlever le milieu de culture et remplacer par du fixateur, soit du glutaraldéhyde 2,5% en tampon Cacodylate 0.1 M, pH 7,2 (contenant éventuellement sucrose 0,1 M,  $\text{CaCl}_2$  5 mM et  $\text{MgCl}_2$  5mM).
- Laisser les cellules en présence de fixateur
  - Soit pendant 1 heure à température ambiante.
  - Soit pendant une nuit à 4°C.
- Laver, soit la nuit à 4°C dans du tampon cacodylate 0.2M, soit deux fois 15 minutes à température ambiante.

**N.B. :** a. La température de fixation n'est pas critique, mais plus la température est élevée, plus la fixation sera rapide.

- b. Le pH optimum de fixation est compris entre 6,8 et 7,5. Au-delà de pH 7,5, le glutaraldéhyde polymérise.
- c. La concentration en glutaraldéhyde utilisée peut varier entre 2,5 et 4,0 % selon le matériel biologique.
- d. Si on fixe des **bactéries**, omettre le sucrose et fixer de préférence à pH 6,8.
- e. Le paraformaldéhyde 2,5%, ou un mélange paraformaldéhyde 2,5% plus glutaraldéhyde 2,5% peuvent être utilisés.

#### b) Fixation au tétroxyde d'osmium

- Remplacer le tampon par du tétroxyde d'osmium 1% en tampon Cacodylate 0.1 M, pH7,2  $\text{CaCl}_2$  5 mM et  $\text{MgCl}_2$  5mM.
- Laisser les cellules en présence de fixateur pendant 1 heure à température ambiante.
- Laver deux ou trois fois avec du tampon Cacodylate sans sucrose.

#### c) Mise en agar 2% en tampon Cacodylate 0.1 M, pH7,2 $\text{CaCl}_2$ 5 mM et $\text{MgCl}_2$ 5mM.

- Gratter les cellules adhérentes ou les centrifuger directement
- Enlever le surnageant
- Concentrer les cellules dans l'agar

#### d) Fixation à l'acétate d'uranyle

- a. Les blocs d'agar sont lavés rapidement : une fois dans l'eau distillée, une fois en tampon Michaelis.
- b. Remplacer le tampon Michaelis par l'acétate d'uranyle 1% préparé en tampon Michaelis.
- c. Laisser les cellules en présence de fixateur pendant 1 heure à température ambiante (TA)

#### e) Déshydratation dans l'acétone ou l'alcool

|                                                                                   |                                                                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                                       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation classique de cellules en culture<br/>Embed812/cacodylate</b> | MET A 1   |

a. **25%, 50%, 75%, 90%** 15 min chaque bain à TA.

b. **100% sec** 3 fois 30 min

**f) Enrobage en résine EPON**

a. **25%** epon dans le solvant (acétone ou alcool) 1h

b. **50%** epon dans le solvant 1h

c. **75%** epon dans le solvant 1 nuit à TA

d. **100%** epon pur 2h à TA

e. **100%** epon pur 2h à 37°C

**g) inclusion et polymérisation**

Inclure les échantillons dans des gélules, capsules ou moules plats à sec avec du mélange d'imprégnation et polymérisation des blocs 24h à l'étuve à 60°C.

**° Préparation des résines**

| Milieu d'enrobage standard à base d'«Epon » |                |                |                |
|---------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                             | Mou (7:3)      | Moyen (5:5)    | Dur (3 :7)     |
| « Epon »                                    | 20 ml (24 g)   | 20 ml (24 g)   | 20 ml (24 g)   |
| DDSA                                        | 22 ml (22 g)   | 16 ml (16 g)   | 9 ml (9 g)     |
| MNA                                         | 5 ml (6 g)     | 8 ml (10 g)    | 12 ml (15 g)   |
| DMP 30                                      | 1.4 ml (1,5 g) | 1.3 ml (1,5 g) | 1.2 ml (1,4 g) |

**Remarque :**

le tampon Michaelis peut être remplacé par du tampon Maléate-NaOH 0.05M PH 6

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                                                    |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                                                 | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation classique de cellules en culture<br/>Embed812/cacodylate version 2</b> | MET A 2   |

1° Fixation au Glutaraldéhyde 1% pendant 1 heure.

(Changer le bain après 30 minutes)

2° Rinçage avec tampon cacodylate pendant 5 minutes.

(3 fois)

3° Fixation à l'osmium 0.5% pendant 30 minutes à 4°C.

(Rinçage au tampon cacodylate, non obligatoire)

4° Déshydratation par l'éthanol :

\_éthanol 30° (2 fois 5 minutes)

\_éthanol 50° (2 fois 5 minutes)

\_éthanol 70° (2 fois 5 minutes)

\_éthanol 90° (2 fois 5 minutes)

\_éthanol 100° (3 fois 5 minutes)

5° Imprégnation par l'Epon :

\_2 volumes d'éthanol + 1 volume d'Epon.

(Entre 4 à 6 heures)

\_1 volume d'éthanol + 1 volume d'Epon.

(Entre 4 à 6 heures)

\_1 volume d'éthanol + 2 volumes d'Epon.

(Entre 4 à 6 heures)

\_Epon pure.

(Entre 4 à 6 heures)

6° Enlever l'Epon en surface.

Gratter les cellules et les mettre dans un eppendorf.

Recouvrir les cellules d'Epon puis les passer à la centrifugeuse.

Enlever le surnageant, remettre de l'Epon et centrifuger.

7° Mettre le culot avec son surnageant d'Epon à l'étuve à 60°C pour la polymérisation.

(Pendant 48 heures)

### **1° Réactifs :**

- Glutaraldéhyde 1% dans tampon cacodylate (pH : 7.2 à 7.4 avec une concentration de 0.1M).

- Tetroxyde d'Osmium 0.5% dans tampon cacodylate (pH : 7.2 à 7.4 avec une concentration comprise de 0.1M).

- Epon: Epon 812 (25g).
- DDSA (13g).
- NMA (12g).
- DMP-30 (32 gouttes).
- (Volume total de 50ml)

Temps total estimé : 4 à 5 jours

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                                        |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                                     | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation classique de cellules en culture<br/>Embed812/sorensen</b> | MET A 3   |

### 1°) Fixation

| Produits                              | Osmolarité      |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1 volume Glutaraldéhyde à 4 %         | 200 mOsM        |
| 1 volume de Sorensen, pH = 7.4, 0.2 M | 200mOsM         |
| <i>Osmolarité totale</i>              | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 4h à 4°C ( 3 jours)*

### 2°) Lavage

| Produits                           | Osmolarité      |
|------------------------------------|-----------------|
| Solution de Sorensen pH=7.4, 0.2 M | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>           | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimum.*

### 3°) Post fixation

| Produits                           | Osmolarité      |
|------------------------------------|-----------------|
| 1 volume de saccharose 0.6 M       | <i>150 mOsM</i> |
| 1 volume de Sorensen pH=7.4, 0.2 M | <i>200 mOsM</i> |
| 2 volumes d'Osmium 2%              | <i>40 mOsM</i>  |
| <i>Osmolarité totale</i>           | <i>390 mOsM</i> |

*Durée : 1 h à T° ambiante*

### 4°) Lavage

Acétate d'uranyle à 2 %

Durée 12 h à 4 ° C

### 5°) Déshydratation

| Bains d'alcool | Temps     |
|----------------|-----------|
| alcool 30°     | 10 mn     |
| alcool 50°     | 10 mn     |
| alcool 70 °    | 10 mn     |
| alcool 95°     | 10 mn     |
| alcool 100°    | 3 x 15 mn |

|                                                                                   |                                                                        |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                                     | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation classique de cellules en culture<br/>Embed812/sorensen</b> | MET A 3   |

### 6°) Substitution

1 volume EMbed 812  
1 volume d'alcool 100°  
1 h à 2 h à *T° ambiante*

### 7°) Imprégnation

EMbed 812, 12h à *T° ambiante* (*changer le bain, laisser 2 h*).

### 8°) Inclusion ( polymérisation )

EMbed 812, renverser des gélules pleines de résine sur les cellules, étuve 60°C de 24 à 48h.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                             |                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01<br>MET A 4 |
|                                                                                   | <b>Protocole de fixation morphologique<br/>peau humaine</b> |                      |

### 1°) Fixation

| Produits                   | Concentration finale | Osmolarité      |
|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Glutaraldéhyde 25 %        | 2 %                  | 200 mOsM        |
| Cacodylate 0.4 M, pH = 7.4 | 0.1 M                | 200mOsM         |
| <i>Osmolarité totale</i>   |                      | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 4h (1h) à 4°C*

### 2°) Lavage

| Produits                 | Concentration finale | Osmolarité      |
|--------------------------|----------------------|-----------------|
| Cacodylate pH=7.4, 0.2 M | 0.2 M                | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i> |                      | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimum.*

### 3°) Découpage

Découper en tranches de 0.5 mm d'épaisseur maximum.

### 4°) Post fixation

| Produits                 | Concentration finale | Osmolarité           |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Cacodylate 0.4 M, pH=7.4 | 0,2 M                | <i>400 mOsM</i>      |
| RuO <sub>4</sub> 0.5 %   | 0.25 %               | ?                    |
| <i>Osmolarité totale</i> |                      | <i>&gt; 400 mOsM</i> |

*Durée : 3 x 20 min à 4°C (agitation supplémentaire toutes les 10 min)*

Manipuler les tubes dans de la glace ou dans un portoir réfrigéré.

Rinçage Tampon cacodylate 0.2 M.

### 5°) Déshydratation

| Bains d'alcool | Temps |
|----------------|-------|
| alcool 30°     | 10 mn |
| alcool 50°     | 10 mn |

|                                                                                   |                                                             |                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01<br>MET A 4 |
|                                                                                   | <b>Protocole de fixation morphologique<br/>peau humaine</b> |                      |

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| alcool 70 °        | 10 mn     |
| alcool 95°         | 10 mn     |
| alcool 100°        | 3 x 15 mn |
| oxyde de propylène | 2 x 15 mn |

#### 6°) Substitution

1 vol Embed 812-Araldite 502 + 2 vol ox. propylène: *1h à T° ambiante*

2 vol Embed 812-Araldite 502 + 1 vol ox. propylène: *1h à T° ambiante*

#### 7°) Imprégnation

Embed 812-Araldite 502, *12 h à T° ambiante.*

#### 8°) Inclusion ( polymérisation )

EmBed 812-Araldite 502, *étuve à 60°C 48h.*

1 vol Embed 812-Araldite 502 + 2 vol ox. propylène: *1h à T° ambiante*

2 vol Embed 812-Araldite 502 + 1 vol ox. propylène: *1h à T° ambiante*

#### 9°) Imprégnation

Embed 812-Araldite 502, *12 h à T° ambiante.*

#### 10°) Inclusion ( polymérisation )

EmBed 812-Araldite 502, *étuve à 60°C 48h.*

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation peau humaine<br/>– conservation des lipides</b> | MET A 5   |

## fixation

|          |                                                                                           |                 |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|          | <b>Morphologie</b>                                                                        |                 |
|          | 2% Glutaraldehyde dans tampon<br>cacodylate de sodium 0,1M                                | durant 4h à 4°C |
| ou       | <b>immunomarquage</b>                                                                     |                 |
|          | 4% Paraformaldehyde + 0,05%<br>Glutaraldehyde dans cacodylate de Na<br>0,1M pH 7,4 durant | 4 h à 4°C       |
| <b>2</b> | <b>Lavage</b>                                                                             |                 |
|          | Cacodylate de Sodium 0,2 M pH 7,4                                                         | (4 lavages)     |
|          | 2 lavages de 5 et 15 mn<br>1 lavage nuit<br>1 Lavage 5 mn                                 |                 |

Redécouper l'échantillon en plus petit



|                                                                                     |                                                                                    |                                                                   |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--|
| <b>3</b>                                                                            | <b>Post Fixation</b>                                                               | <b>Conservation des structures<br/>lipidiques</b>                 |  |
| (manipuler à<br>l'obscurité)                                                        | Tetroxide de Ruthénium RuO <sub>4</sub> 0,25%<br>dans cacodylate de Na 0,2M pH 7,4 | 3 fois 20 mn<br>(renouveler le<br>fixateur en agitant)<br>à 4°C . |  |
|  |                                                                                    |                                                                   |  |
| <b>4</b>                                                                            | <b>Lavage</b>                                                                      |                                                                   |  |
|                                                                                     | Cacodylate de Sodium 0,2 M pH 7,4                                                  |                                                                   |  |
|                                                                                     |                                                                                    | 2 fois 10 mn                                                      |  |
| <b>5</b>                                                                            | <b>déshydratation</b>                                                              |                                                                   |  |
|                                                                                     | alcool 30°                                                                         | 10 mn                                                             |  |
|                                                                                     | alcool 50°                                                                         | 10 mn                                                             |  |
|                                                                                     | alcool 70 °                                                                        | 10 mn                                                             |  |
|                                                                                     | alcool 95°                                                                         | 10 mn                                                             |  |
|                                                                                     | alcool 100°                                                                        | 3 x 15 mn                                                         |  |
|                                                                                     | oxyde de propylène                                                                 | 2 x 15 mn                                                         |  |

## Substitution

**1 vol Embed 812-Araldite 502 + 2 vol ox. propylène: 1h à T° ambiante**

**2 vol Embed 812-Araldite 502 + 1 vol ox. propylène: 1h à T° ambiante**

|                                                                                   |                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation peau humaine<br/>– conservation des lipides</b> | MET A 5   |

### **Imprégnation**

**EmBed 812, 12 h à  $T^{\circ}$  ambiante.**

### **Inclusion (polymérisation)**

**EmBed 812-Araldite 502, étuve à 60°C 48h.**

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                                |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                             | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation Morphologique<br/>Botanique Racines et Nodules</b> | MET A 6   |

**1. Fix** in 3% GTA/1%PF in 0.2M NaCac buffer with 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> pH7.2:

Cut 1-3mm<sup>3</sup> root nodule discs and place in fresh fix; apply gentle vacuum until specimens sink; then complete fine trimming of samples (@ 1mm<sup>3</sup>), if necessary. Place in fresh fix and leave under vacuum overnight.

Fix prep: 2ml 70% GTA + 11ml. 0.4 M Cacodylate with 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2; 22ml. 0.2 M Cacodylate with 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2 and 11ml 4%PF in dH<sub>2</sub>O with 5mM CaCl<sub>2</sub>. DAY 1

**2. Rinse** in 0.3M NaCac buffer with 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2. several washes over one hour, with light vacuum

**3. Post-fix** in 2% OsO<sub>4</sub> in 0.25M NaCac buffer with 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2, for 3 hours at RT.

Fix Prep: 1 vol. 4% OsO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O. + 1 vol. 0.4 M Cacodylate with 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2 + 2 vol. 0.3 M Cacodylate with 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.2.

**4. Rinse** in dH<sub>2</sub>O. Dehydrate 30%, 50% 70% 95% ETOH 15-30 minutes each.

**5. Rinse** in 100% ETOH three times over 1 hour. Can store in fridge at this point, if necessary. DAY 2

**6. Two changes in Propylene Oxide** 15-30 minutes each.

EPON:PO { 1.5:1 } several changes over 3-4 hours in sealed vials, on rotator; then under vacuum overnight. DAY 3

**7. Transfer to BEEM Capsules** and fresh EPON under vacuum for 24 hrs: DAY 4

**8. Polymerize** (to enhance infiltration of the tissue block:

a. Heat 8 hrs at 45 C.

b. Increase heat to 60° C for an additional 40 hrs.

***Stock buffers:***

*0.4 M Na Cacodylate + 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.2*

*0.3 M Na Cacodylate + 2.5mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.2*

***References:*** *Jelesko J G et al. 1993, MPMI 6(1), 135-143*

*Vasse J. et al. 1990, J. Bacteriol. 172(8), 4295-4306*

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation Morphologique<br/>des cerveaux d'abeille</b> | MET A 7   |

1. Ouvrir une fenêtre dans la cuticule de chaque tête, enlever les glandes et trachées et éponger le maximum d'hémolymph. Déposer une goutte de fixateur dans l'ouverture, puis déposer les têtes dans un eppendorff de fixateur. Bien agiter pour enlever les bulles d'air et s'assurer que toutes les têtes sont immergées. Laisser 2h à 4°C.

#### **Fixateur:**

*A préparer toujours le jour même:*

***Paraformaldéhyde**.....1%*  
***Glutaraléhyde**..... 2.5%*  
*Tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2*

#### **Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2:**

Pour 200 ml:  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ..... 0,52 gr.  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ..... 5,80 gr.

**NB:** Pour 10 ml, dissoudre 0,1 g de paraformaldéhyde dans 6 ml d'eau milli-Q, dans un tube Falcon de 50 ml. Chauffer le liquide à 50-55 °C maximum en maintenant le tube fermé, et agiter jusqu'à ce que le paraformaldéhyde se dissolve. Ajouter 10 µl de NaOH 1 N pour clarifier la solution. Filtrer avec une seringue et un filtre de 0,22 µm, et laisser refroidir à température ambiante. Ajouter ensuite 2 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH 7,2 et 1 ml de glutaraldéhyde à 25% pour microscopie électronique. Compléter à 10 ml avec du tampon phosphate.

2. Disséquer les cerveaux dans du fixateur frais, et les mettre à fixer toute la nuit à 4°C (dans du fixateur frais)

3. Laver dans le tampon phosphate (2 x 10 min)

4. *Sous la hotte :* préparer une solution de tétr oxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ , très toxique) à 1% dans le tampon phosphate. Déposer les cerveaux dans cette solution dans tube eppendorff pour la post-fixation, pendant 1h à RT

**NB:** Jeter le matériel ayant été en contact avec l'osmium dans une poubelle spéciale. Une fois préparée, la solution d'osmium peut être aliquotée et conservée à -20°C.

5. Laver à nouveau dans le tampon phosphate (2 x 10 min) et laisser la nuit dans le tampon phosphate

6. Laver dans le tampon maleate et passer à un bain d'acétate d'uranyle (1% dans tampon maléate) 1h RT

7. Déshydrater dans des solutions d'éthanol de concentration croissante:

EtOH 30% dans l'eau milli-Q .....10 min.

|                                                                                   |                                                          |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation Morphologique<br/>des cerveaux d'abeille</b> | MET A 7   |

EtOH 50% dans l'eau milli-Q ..... 10 min.  
 EtOH 70% dans l'eau milli-Q..... 10 min.  
 EtOH 90%. l'eau milli-Q..... 10 min.  
 3 x EtOH 100%.à sec..... 30 min.

8. Steps de passage progressif en résine 812 DER 736 (plus fluide) dans tube en verre

25% résine dans EtOH 100%.à sec. 1h RT

50 % résine dans EtOH 100%.à sec. 1h RT

75% résine dans EtOH 100%.à sec. La nuit RT

9. Le lendemain, préparer de l'epon fraîche et mettre les échantillons en résine pure 2h à RT puis autre bain de résine pure 2h à 37°C.

Couler résine fraîche, dans les moules. Placer un cerveau dans chaque moule, en l'orientant de manière à ce qu'il soit le plus droit possible, avec la face antérieure (où sont les lobes antennaires) vers l'extérieur du moule. Mettre à polymériser au moins 48 h à 60°C.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                            | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation de cellules sur lamelles<br/>Spurr/cacodylate</b> | MET A 8   |

| Etapes                 | Echantillon pour Morphologie                                                                       | Temps et T°C                                                                  |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fixation</b>        | Glutaraldehyde 2.5% dans tampon cacodylate de sodium 0,1M pH 7,2 /sucrose 0.1M+CaCl2 5mM+MgCl2 5mM | 1h total RT                                                                   |
| <b>Lavage 1</b>        | Tampon cacodylate 0,1M pH 7,2 +CaCl2 5mM+MgCl2 5mM                                                 | 3 bains de 5 min<br><br>1h à RT<br>3 bains de 5min<br>→ échantillons à 4°C ON |
| <b>Post Fixation</b>   | Tetroxyde d'osmium 1% dans tampon caco. 0,1M pH 7,2 +CaCl2 5mM+MgCl2 5mM                           |                                                                               |
| <b>Lavage 2</b>        | Tampon cacodylate 0,1M pH 7,2 +CaCl2 5mM+MgCl2 5mM                                                 |                                                                               |
| <b>Post fixation 2</b> | Acetate d'uranyle 1% en tampon michaelis (ou tampon maleate-NaOH 0.05mM PH 6)                      |                                                                               |
| <b>déshydratation</b>  | Degré croissant alcoométrique 25%, 50%, 75%, 90% 100% Ethanol sec                                  | 10 min par bain<br><br>avec 3 bains successifs pour alcool 100% à sec         |
| <b>Substitution 1</b>  | 1/3 résine SPURR<br>2/3 Ethanol 100                                                                | 30min                                                                         |
| <b>Substitution 2</b>  | ½ résine SPURR<br>½ Ethanol 100% sec                                                               | 30min                                                                         |
| <b>Substitution3</b>   | 2/3 résine SPURR<br>1/3 Ethanol 100% sec                                                           | Une nuit                                                                      |
| <b>Imprégnation 1</b>  | SPURR pure Sp1                                                                                     | 30 ou 60 min                                                                  |
| <b>Imprégnation 2</b>  | SPURR pure SP2                                                                                     | 2h                                                                            |

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

**Echantillons** : remplir les gelules de SPURR. (faire bomber la résine) et faire glisser la lamelles au dessus de la gelule.

Faire polymériser entre 20h et 24h pas plus à 60°C et enlever la lamelle de verre en la plongeant dans l'azote et refaire polymeriser le bloc qqh si necessaire.

|                                                                                   |                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                            | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation de cellules sur lamelles<br/>Spurr/cacodylate</b> | MET A 8   |

***Composition mélange Sp1 et Sp2 de résine SPURR***

|            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| <b>Sp1</b> | NSA : 39g  | <b>Sp2</b> | NSA : 52g  |
|            | ERL : 15 g |            | ERL : 20 g |
|            | DER : 9g   |            | DER : 12g  |
|            | S-1 : 0.3g |            | S-1 : 0.8g |

***Recette tampon maleate-NaOH 0.05m PH6s***

Pour 80ml :  
maleic acid 0.464g  
NaOH 0.16g  
Dissoudre dans 16ml H2O milliq  
Ajuster PH à 6  
Completer avec H2O à 80ml

|                                                                                   |                                                |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique             | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation Morphologique<br/>de Bactéries</b> | MET A 9   |

1° Fixation au Glutaraldéhyde 5% final en tampon Cacodylate de Sodium pendant 30min.à RT  
(1 volume de bactéries avec 1 volume de gluta 5%)

2° Centrifugation à 5000rpm pendant 10min

3° Resuspendre le culot dans Glutaraldéhyde 2.5% final en tampon Cacodylate de Sodium 2H à RT

2° Rinçage avec tampon cacodylate pendant 5 minutes.  
(3 fois)

3° Fixation a l'osmium 1% en tampon cacodylate toute la nuit à 4°C.

4° Rinçage avec tampon cacodylate pendant 5 minutes  
(3 fois)

5° Concentration des bactéries en Agar 2% en tampon cacodylate

6° Déshydratation par l'éthanol :

- \_éthanol 30° (15 minutes)
- \_éthanol 50° (15 minutes)
- \_éthanol 70° (15 minutes)
- \_éthanol 90° (15 minutes)
- \_éthanol 100° (3 fois 30 minutes)

7° Imprégnation par l'Epon :

- \_2 volumes d'éthanol + 1 volume d'Epon.  
(Entre 1 heure)
- \_1 volume d'éthanol + 1 volume d'Epon.  
(Entre 1 heure)
- \_1 volume d'éthanol + 2 volumes d'Epon.  
(toute la nuit)
- \_Epon pure.  
(Entre 4 a 6 heures)

8° Mettre le culot avec son surnagent d'Epon à l'étuve à 60°C pour la polymérisation.  
(Pendant 48 heures)

### **Réactifs :**

- Glutaraldéhyde dans tampon cacodylate (pH : 7.2 à 7.4 avec une concentration de 0.1M).
- Tetroxyde d'Osmium 1% dans tampon cacodylate (pH : 7.2 à 7.4 avec une concentration de 0.1M).

|                                                                                   |                                                |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Électronique             | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation Morphologique<br/>de Bactéries</b> | MET A 9   |

- Agarose low melting point 2% dans tampon cacodylate (pH : 7.2 à 7.4 avec une concentration de 0.1M).
- Epon: Epon 812 (25g).  
DDSA (13g).  
NMA (12g).  
DMP-30 (32 gouttes).  
(Volume total de 50ml)

**Temps total estimé : 4 à 5 jours.**

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                         |                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>               | Indice 01<br>MET A 10 |
|                                                                                   | <b>Préparation de tissus dans le tampon de Sorensen</b> |                       |

### 1°) Fixation

| Produits                              | Concentration finale | Osmolarité      |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 volume Glutaraldéhyde à 4 %         | 2 %                  | 200 mOsM        |
| 1 volume de Sorensen, pH = 7.4, 0.2 M | 0.1 M                | 200mOsM         |
| <i>Osmolarité totale</i>              |                      | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 4h (1h) à 4°C*

### 2°) Lavage

| Produits                           | Osmolarité      |
|------------------------------------|-----------------|
| Solution de Sorensen pH=7.4, 0.2 M | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>           | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimum.*

### 3°) Découpage

Découper en cube de 1 mm de coté

### 4°) Post fixation

| Produits                           | Concentration finale | Osmolarité      |
|------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 volume de saccharose 1 M         | 0.250 M              | 250 mOsM        |
| 1 volume de Sorensen pH=7.4, 0.2 M | 0.5 M                | 100 mOsM        |
| 2 volumes d'Osmium 2%              | 1 %                  | 40 mOsM         |
| <i>Osmolarité totale</i>           |                      | <i>390 mOsM</i> |

*Durée : 1 h à T° ambiante*

### 5°) Déshydratation

| Bains d'alcool     | Temps     |
|--------------------|-----------|
| alcool 30°         | 10 mn     |
| alcool 50°         | 10 mn     |
| alcool 70 °        | 10 mn     |
| alcool 95°         | 10 mn     |
| alcool 100°        | 3 X 15 mn |
| oxyde de propylène | 2 x 15 mn |

|                                                                                   |                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>               | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de tissus dans le tampon de Sorensen</b> | MET A 10  |

### 6°) Substitution

1 volume EmBed 812  
1 volume d'oxyde de propylène  
1 h à 2 h à  $T^{\circ}$  ambiante

### 7°) Imprégnation

EmBed 812, 12h à  $T^{\circ}$  ambiante (*changer le bain, laisser 2 h*).

### 8°) Inclusion ( polymérisation )

EmBed 812, étuve à 60°C de 24 à 48h.

### 9°) Coupes

### 10°) Coloration :

- Acétate d'uranyle 3% dans l'Ethanol 50 %, 2 min
- Citrate de plomb 8,5 %, 10 min

|                                                                                   |                                                        |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>              | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de tissus dans le tampon cacodylate</b> | MET A 11  |

### 1°) Fixation

| Produits                                | Concentration finale | Osmolarité      |
|-----------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 volume Glutaraldéhyde à 4 %           | 2 %                  | 200 mOsM        |
| 1 volume de Cacodylate, pH = 7.4, 0.4 M | 0.1 M                | 200mOsM         |
| 1 vol d'H <sub>2</sub> O distillée      |                      |                 |
| <i>Osmolarité totale</i>                |                      | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 4h (1h) à 4°C*

### 2°) Lavage

| Produits                             | Osmolarité      |
|--------------------------------------|-----------------|
| Solution de Cacodylate pH=7.4, 0.2 M | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>             | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimum.*

### 3°) Découpage

Découper en cube de 1 mm de coté

### 4°) Post fixation

| Produits                             | Concentration finale | Osmolarité      |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 volume de Cacodylate pH=7.4, 0.4 M | 0.2 M                | <i>400 mOsM</i> |
| 1 volume d'Osmium 2%                 | 1 %                  | <i>40 mOsM</i>  |
| <i>Osmolarité totale</i>             |                      | <i>440 mOsM</i> |

*Durée : 1 h à T° ambiante*

### 5°) Déshydratation

| Bains d'alcool     | Temps     |
|--------------------|-----------|
| alcool 30°         | 10 mn     |
| alcool 50°         | 10 mn     |
| alcool 70 °        | 10 mn     |
| alcool 95°         | 10 mn     |
| alcool 100°        | 3 X 15 mn |
| oxyde de propylène | 2 x 15 mn |

|                                                                                   |                                                            |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                  | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de tissus dans le tampon<br/>cacodylate</b> | MET A 11  |

### 6°) Substitution

1 volume EmBed 812  
1 volume d'oxyde de propylène  
1 h à 2 h à  $T^{\circ}$  ambiante

### 7°) Imprégnation

EmBed 812, 12h à  $T^{\circ}$  ambiante (*changer le bain, laisser 2 h*).

### 8°) Inclusion ( polymérisation )

EmBed 812, étuve à 60°C de 24 à 48h.

### 9°) Coupes

### 10°) Coloration :

- Acétate d'uranyle 3% dans l'Ethanol 50 %, 2 min
- Citrate de plomb 8,5 %, 10 min

|                                                                                   |                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation de cellules en culture pour<br/>Immuno-marquage</b> | MET B 1   |

- 1. Fixer 1 heure au PAF 4% + 0,1 % Glutaraldehyde à température ambiante dans du cacodylate de sodium 0,2M**
  - 2. Lavage dans du tampon cacodylate de sodium 0,2 M ( deux bains 15mn )**
  - 3. Traiter à la lysine 0,05 M 30 mn**
  - 4. Lavage Tampon cacodylate 0,1M (2 bains de 15 mn**
  - 5. déshydratation alcoolique 30° à 100°**
  - 6. Imprégnation 2/3 alcool 100 + 1/3 LRWhite**
  - 7. Imprégnation 1/2 alcool 100 + 1/2 LRWhite**
  - 8. Imprégnation 1/3 alcool 100 + 2/3 LRWhite**
  - 9. Imprégnation LRWhite 100 %**
- Inclusion LRWhite, polymérisation 46°C, durant 48h**

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>      | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation de levures pour Immunomarquage</b> | MET B 2   |

### **FIXATION MET Levure PFA (immuno ou Hybridation)**

- 1° **Fixation** paraformaldehyde (PFA) 4% dans du cacodylate de Na 0,1M  
Mélanger à volume égal : 8% PFA avec le milieu de culture
- 2° Centrifuger 2800 t/mn durant 5 mn  
**Rincer** le culot avec du cacodylate Na 0,1M environ 5ml à RT (room température)  
(3 rinçages), attente dans la glace avant d'inclure Agarose
- 3° Inclusion du culot cellulaire dans **Agarose** 1% Cacodylate de Na 0,1M +7% saccharose. Mettre environ 15 à 20 µl d'agarose/culot.
- 4° **Étaler l'agarose** (forme rectangulaire) sur une lame de verre propre déposée sur la glace puis découper en petits morceaux , puis récupérer dans des salières dans du Cacodylate Na 1%
- 5° Traiter durant 1h à RT dans **Metaperiodate de Na** à 1% dans l'eau (soit 0,25g/25ml eau)  
**étape non obligatoire permet de permeabiliser les membranes épaisses ou paroi**
- 6° **Rincer** dans du cacodylate de Na 0,1 M durant 5 mn à RT
- 7° Traiter par le **NH<sub>4</sub>Cl** (500mM) dans du cacodylate de Na 0,1M soit ( 0,63g/25ml) durant  
**1h à RT (permet d'éviter l'accrochage des billes d'or sur des zones non spécifiques)**
- 8° **Rincer** cacodylate de Na 0,1M 5mn à RT
- 9° **Déshydrater** alcool éthylique (Éthanol) à degré croissant selon les bains suivants  
30°, 50°, 70°, 95°, 95°, 100°, 100° (15 mn pour chaque bain)
- 10° Première **imprégnation** au LRWhite (50% alcool absolu + 50% LRWhite) 5h, RT
- 11° Deuxième **imprégnation** dans LRWhite médium pur toute la nuit à RT
- 12° troisième **imprégnation** toute la journée LRWhite pur
- 13° **Inclusion** en fin de journée (46°c)  
N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                            |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                  | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation générale pour cryocoupes et immunomarquage</b> | MET B 3   |

## Chemicals

- Glutaraldehyde (GA): Use 8% EM grade glutaraldehyde from Polyscience (Cat.00216). Glutaraldehyde can be stored in the refrigerator provided the vial is completely sealed. Never store it in the same fridge as your antibodies!
- (para)formaldehyde (PFA): It is important to use formaldehyde that is freshly prepared from paraformaldehyde prills (Sigma 441244). Never use formalin! Since it takes some time to prepare the PFA solution I strongly advise to make 100 ml of a 16% stock solution and store this in portions in the freezer, it will save time and trouble later.

## Stock solution of 16% PFA in distilled water

1. Add 16 g para-formaldehyde to 75 ml distilled water
2. Place the solution “au bain marie” (in another beaker with hot water) on a combined stirrer/heater in the hood and let it, under constant stirring, reach a temperature of 60°C, NOT warmer !
3. Add 0.1 M NaOH in distilled water till the solution gets to PH 7. Stirr for 15 min. 60°C, NOT warmer ! check the PH7. At this point the solution is not clear.
4. Add distilled water to an end volume of 100 ml.
5. Filter the solution (becomes clear) and store in portions in the freezer. Each time that PFA fixative is required a tube can be thawed and used. Upon thawing the solution will remain white. Keep the PFA-vial then in hot (tap) water till it gets clear again. Do not use the solution if it does not get clear.

## Phosphate Buffer

Fixatives are buffered in phosphate buffer, never use PBS (not strong enough)

Stock-solution of 0.2 M phosphate buffer:

Buffer A:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 27.6 \text{ g}$  in 1000 ml distilled water

Buffer B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 35.6 \text{ g}$  or  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 53.65 \text{ g}$  or  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 71.7 \text{ g}$  in 1000 ml distilled water.

Add 19 ml buffer A to 81 ml buffer B to get 0.2 M phosphate buffer, pH7.4. Check pH and if necessary add more of the appropriate buffer to get pH7.4

## Fixation procedure

fix cells directly after removal from the incubator

use fixatives at room temperature

prepare fixative solutions always fresh

work in the hood, especially when glutaraldehyde is used

never let fixed cells fall dry.

a general rule is that there are enough cells for EM processing when they can be centrifuged into a visible pellet. This of course depends on the cell type and confluence grade. Usually a 25 or 75 cm<sup>2</sup> flask is enough.

|                                                                                   |                                                            |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                  | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation générale pour cryocoupes et immunomarquage</b> | MET B 3   |

Fixed samples can be shipped at room temperature in 1% PFA/0.1M phosphate buffer  
fixative fumes inactivate antibodies. Never store or package fixatives and antibodies together.

#### **A: FIXATION 4% PFA**

Cells are fixed in 4% PFA overnight and stored/send in 1% PFA.

To avoid that they get a too big osmotic shock they are first fixed for a short time in 2% formaldehyde.

Fixative A: 4% freshly prepared PFA (from 16% stock)  
0.1M phosphate buffer

1. Do not wash the cells, but gently add a volume of fixative that is equal to the volume of culture medium  
(endconcentration of fixative will then be 2% PFA)
2. Fix cells for 5 min at room temperature
3. Remove the fixative (do not let the cells fall dry!) and fill the flask or dish completely with fixative A  
(endconcentration will now be 4% PFA). Fix the cells overnight at 4°C.
4. Replace the fixative for 1% PFA, store at 4°C.  
For shipment: fill the flask completely and wrap in parafilm. In case of a dish: fill the dish completely, put parafilm on top, close the lid, wrap again with parafilm.

#### **B: FIXATION 2% PFA 0.2% GA**

Fixative B (2X concentrated): 4% freshly prepared PFA (from 16% stock)  
0.4% GA (from 8% stock)  
0.1 M phosphate buffer

Fixative B (1X): 2% freshly prepared PFA (from 16% stock)  
0.2% GA (from 8% stock)  
0.1 M phosphate buffer

1. Do not wash the cells but gently add a volume of fixative (2X conc.) that is equal to the volume of culture medium (endconcentration will then be 2% PFA + 0.2% GA).
2. Fix cells for 5 min at room temperature and then remove the fixative and quickly replace it with fixative B 1X (2% PFA + 0.2% GA in 0.1 M phosphate buffer)
3. Fix cells for 2 h at room temperature or overnight at 4°C.
4. Replace the fixative for 1% PFA, store at 4°C.  
for shipment: fill the flask completely and wrap in parafilm. In case of a dish: fill the dish completely, put parafilm on top, close the lid, wrap again with parafilm.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                              |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                    | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation pour cryocoupes et immunomarquage de levures</b> | MET B 4   |

### Fixation

- Transfer 10 ml of yeast culture ( $OD_{600}$  = approx. 1) directly from the incubator to a 50 ml Falcon tube containing 10 ml of 2x concentrated fixative (4% PFA + 0.4% GA in 0.1M PHEM buffer) at room temperature.
- Incubate 20 min at room temperature on a roller bank.
- Centrifuge at 1000 rpm for 7 minutes.
- Decant supernatant and add 10ml of 1x fixative (2% PFA + 0.2% GA in 0.1M PHEM buffer)
- Incubate further for 2 hours at room temperature on a roller bank.
- Centrifuge at 1000 rpm for 7 minutes.
- Resuspend the pellet in 1 ml of 0.1M PHEM buffer and transfer to a 1.5 ml microfuge tube.

### Pre-embedding and embedding

- Wash the cells 3x in 0.1M PHEM buffer.
  - Between each wash, briefly centrifuge in a minifuge (few seconds).
- Add 1% of freshly-prepared Periodic Acid in 0.1M PHEM buffer (the periodic acid will cleave the sugar groups causing the cell wall to stay in its place.).
- Incubate at room temp for 1 hour on a roller bank or a rotating wheel at a slower speed.
  - Again, wash 3x with 0.1M PHEM buffer with a brief centrifuge time in the minifuge. (Yeast cells tend to clump together after this stage...you can try to resuspend them by means of a Pasteur pipette but the chances are that some clumps will remain.).
  - After the last rinse, remove all the buffer (don't let the cells fall dry!) and add 12% gelatine in 0.1M PHEM buffer.
  - Incubate the cells at 37°C for 5-10 minutes (this step is necessary to make sure that the yeast clumps are properly infiltrated).
  - Cool the samples down on ice (if you run out of time, you can keep the sample in gelatine at 4°C overnight).
  - Cut blocks of 1 mm<sup>3</sup>.
  - Incubate the blocks in 2.3M sucrose/PHEM buffer at 4°C overnight on a rotary mixer.
  - Mount the blocks on pins and freeze them in liquid nitrogen.

### Trimming and cutting

- The trimming can be performed at either -100°C or -120°C.
  - Cutting is performed at -120°C. If sections are too thick, the details inside the cells cannot be seen.
- Therefore prepare silver-looking sections (approx. 50-55 nm).
- Check the first sections under the microscope to control the cutting step.
  - Pick-up: ½ methyl-cellulose + ½ 2.3 M sucrose (does not need to be in PHEM buffer!)

### SOLUTIONS

#### **- PHEM buffer (pH 6.9)**

for 100 ml:

3.63 g of PIPES (final concentration: 120 mM)

1.19 g of HEPES (final concentration: 50 mM)

|                                                                                   |                                                              |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                    | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Fixation pour cryocoupes et immunomarquage de levures</b> | MET B 4   |

0.08 g of  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (final concentration: 4 mM)

0.76 g of EGTA (final concentration: 20 mM)

- First solubilize 3 pellets of NaOH in 75 ml of  $H_2O$ .

- Add and dissolve the 3.63 g of PIPES.

- Verify the pH, it should be around 7.

- Add and solubilized the 1.19 g of HEPES, then the 0.08 g of  $MgCl_2$  and finally the 0.76 g of EGTA.

- Verify the pH (it should be around 4) and adjust to pH 6.9 by adding drops of 1 M NaOH.

- Adjust the volume to 100 ml with water.

**- 2x concentrated fixative**

4% para-formaldehyde (PFA) (stock 16%, keep at -20C)

0.4% glutaraldehyde (GA) (stock 8% keep at 4C)

in 0.1M PHEM buffer (stock 0.2M)

**- 1x concentrated fixative**

2% para-formaldehyde (PFA)

0.2% glutaraldehyde (GA)

in 0.1M PHEM buffer

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                       |                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>             | Indice 01<br>MET B 5 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage en post-inclusion<br/>Version 1</b> |                      |

### *Version 1*

### **Attention sur Echantillons inclus dans resine acrylique et grilles Ni, ou Au**

**1°rincer les grilles 3 fois 5minutes dans l'eau dé sionisée à Température ambiante (RT)**

**2°incuber les grilles 2 fois 5 minutes en PBS/BSA 2% (filtrer 0,2μ), RT**

**3° incuber 2 heures l'anticorps I en PBS/BSA 2% (filtrer 0,2μ) , RT (chambre humide)**

**4°rincer 5 minutes en PBS/BSA 2% (filtrer 0,2μ),**

**5°rincer 5 fois 5 minutes en PBS/BSA 1% (filtrer 0,2μ),**

**6° incuber 1 heure dans l'anticorps II (mono ou polyclonal) dans PBS/BSA 1%, RT\*(chambre humide)**  
dilution 1/50 soit 1μl de sonde dans 49 μl de PBS/BSA 1% (choix en fonction AntiCorps primaire)

**7°rincer 4 fois 5 minutes dans PBS/BSA 1% (filtrer 0,2μ), RT.**

**8°incuber 15 minutes dans PBS/Gluta. 1%**  
soit 10 ml de PBS en 400μl gluta.25%

**9°rincer 2 fois 5 minutes en PBS, RT.**

**10°rincer 3 fois dans trois bechers d'eau désionis ée, RT**

**11°sécher à l'abri de la poussière, RT.**

### **Réactifs :**

**PBS Marie-Lyne (0,15M NaCl ; 0,01 M  $PO_4HNa_2$  12H<sub>2</sub>O ; 0,01M  $PO_4H_2K$  , pH 7,2 à 7,4).**

**Tampon PBS (pH=7,2) pour 1000ml H<sub>2</sub>O**

- 7,65 g de NaCl + 0,724 g de  $Na_2PO_4$  + 0,210 g de  $NaPO_4$

**PBS/BSA 1%** (préparer juste avant emploi)

0,25g de BSA dans 25 ml de PBS ou 0,1g de BSA dans 10 ml de PBS.ajuster pH :7,4 (filtrer 0,2μ),

**PBS/BSA 2%** (préparer juste avant emploi)

0,5g de BSA dans 25 ml de PBS ou 0,2g BSA dans 10 ml de PBS , ajuster pH 7,4 (filtrer 0,2μ),

**ATTENTION FAIRE UN TEMOIN POSITIF**

***ATTENTION : temps de manipulation minimum 5 heures***

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                   | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage en post-inclusion</b><br><b>Version 2</b> | MET B 6   |

### **Fixation des cellules:**

Fixation 2 à 4% PFA dans tampon Phosphate 0,1 M

Déshydrater dans l'alcool éthylique 30° a 90°

Substituer, imprégner et inclure dans une résine acrylique (LR White, Unicryl, HM20, LR gold)

Couper entre 70 et 90 nm sur grilles Nickel recouverte Formvar carbone

Traiter rapidement solution 0,05 M glycine durant 15 mn (sature les aldéhydes)

### **ImmunoMarquage :**

- 1- Rincez dans 0,1M PBS 3 fois 5mn
- 2- Solution blocage 30 à 45 mn (solution 2%BSA, 0,1% cold water Fish Gelatin et 0,1% Tween dans PBS 0,1M)
- 3- Anticorps Primaire OverNight à 4° (attention les coupes ne doivent pas sécher)  
l'anticorps primaire est diluer dans 0,1% BSA-C et 0,05 tween dans PBS 0,1M
- 4- Rincez dans 0,1% BSA-C et 0,05 tween dans PBS 0,1M 3 fois 5mn
- 5- Anticorps secondaire 2h RT ou OverNight à 4°C l'immunogold est diluer dans 0,1% BSA-C et 0,05 tween dans PBS 0,1M
- 6- Rincer dans BSA-C 0,1% dans PBS 0,1M 3 fois 5 mn
- 7- Rincer dans l'eau 3 fois 3 mn ou dans bécher
- 8- Fixer 2,5% glutaraldehyde dans PBS 0,1M durant 5 mn
- 9- Rincer dans un bécher trois fois dans l'eau distillée
- 10- Amplification signal pour immunogold ultrasmall 1,4nm, utiliser silver Enhancement durant 45 mn
- 11- Rincer à l'eau trois fois puis contraster uranyl/plomb

**Reference:** EM center Indiana University School of Medecine

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                    |                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>          | Indice 01<br><br>MET B 7 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage post-inclusion<br/>version 3</b> |                          |

Coupes LR White sur grilles en or ou Nickel membranées Collodion(ou Formvar) - Carbone .

| Solutions                                                                           | Préparation                                                        | Temps                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O                                                                    |                                                                    | 30 min                               |
| NH <sub>4</sub> Cl 50 mM - PBS                                                      | NH <sub>4</sub> Cl : 26.7 mg<br>PBS : 10 ml                        | 10 min                               |
| Tampon de saturation :<br>NGS 1/20 – BSA 1% - Tween 20 0,2% - PBS                   | NGS : 25 µl<br>BSA 15 % : 34 µl<br>Tween 20 : 1 µl<br>PBS : 440 µl | 15 min                               |
| Anticorps I (concentration à ajuster selon Ag)<br>(dilué dans NGS-BSA-Tween 20-PBS) | selon le nombre de<br>grilles (10 à 20 µl/gr.)                     | 1h à 3 h à TA<br>Ou over night à 4°C |
| BSA 0,1% - PBS                                                                      | BSA 15 % : 7 µl<br>PBS : 993 µl                                    | 3 x 7 min                            |
| Gélatine 0,1% - PBS                                                                 | Gélatine : 1 µl<br>PBS : 1 ml                                      | 5 min                                |
| Anticorps II 1/50<br>(dilué dans Gélatine-PBS)                                      | selon le nombre de<br>grilles (10 à 20 µl/gr.)                     | 45 min                               |
| PBS                                                                                 |                                                                    | 2 x 5 min                            |
| Glutaraldéhyde 1% - PBS                                                             | Gluta 25 % : 50 µl<br>PBS : 1.2 ml                                 | 5 min                                |
| H <sub>2</sub> O                                                                    |                                                                    | 5 min                                |

à T° ambiante

### NGS : Normal Goat Serum

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>         | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage Pre Embedding<br/>selon BBI</b> | MET B 8   |

1. Dissect tissue to smallest possible size (e.g. 0. 5mm) for handling and good penetration
2. Lightly fix tissue in 2-4% paraformaldehyde +/- low concentration (0-0.1%) of gluteraldehyde for a short time period (15-30 min) depending on tissue size.
3. Wash tissue very thoroughly in buffer (e.g. 1 hour, see buffer protocol) to remove excess aldehyde.
4. Optionally permeabilise tissue with low concentration of detergent (e.g. 0.1% Tween 20 or Triton X in PBS) for 15-30 min.
5. Wash tissue very thoroughly in PBS for 1 hour
6. Incubate with primary antibody for 1-4 hours (see incubation protocol). All incubations and washes should be performed while agitating.
7. Wash in buffer very thoroughly (e.g. 1 hour) to remove excess antibody.
8. Incubate with second antibody (preferably 1 nm conjugate) for 1-4 hours (see incubation protocol)
9. Wash in PBS very thoroughly (e.g. 1 hour) to remove excess gold conjugate.
10. Fix tissue in 1% gluteraldehyde in PBS for 15 min to strengthen antibody binding to tissue.
11. Wash thoroughly in water (e.g. 30 min) to remove excess aldehyde.  
Optional silver enhancing:
12. Silver enhance for 5-15 min (experiment with a number of blocks of tissue to determine time)
13. Wash thoroughly in deionised or distilled water (30 min) to stop enhancing
14. Continue to dehydration and embedding in epoxy or acrylic resin for sectioning.

## References

1. J Doerr-Schott (1989) "Colloidal gold for multiple staining" in Hayat MA, Colloidal Gold, Vol. 1 (Ch 5)
2. C. Ferrari, et al (1989) "Pre-embedding immunogold staining of cell surface antigens performed on suspended cells and tissue sections" in Hayat MA, colloidal Gold, Vol. 2 (Ch 16)
3. E Kellenberger (1991) "Some basic concepts for the choice of methods" in Hayat MA, Colloidal Gold, Vol. 3 (Ch 1).

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                  |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>        | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage<br/>Nanogold Pre-Embedding</b> | MET B 9   |

## High-Density, Reliable Pre-Embedding Nanogold® Labeling Procedures

### Contents

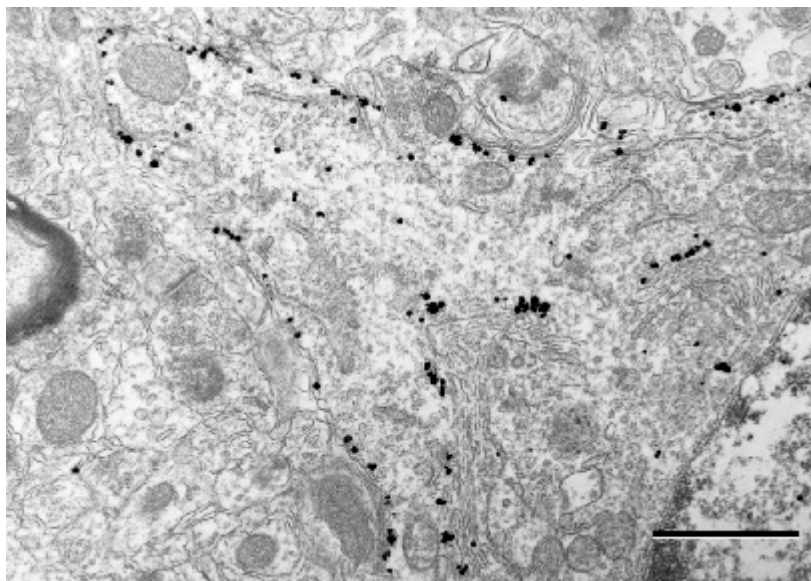
- [Procedure using HQ Silver Enhancement](#)
- [Procedure using Gold Enhancement](#)

---

### Procedure using HQ Silver Enhancement

- Higher density gold labeling than with other methods.
- Very high specificity.
- Maximum resolution.

This procedure has been described by Tanner and co-workers, and is reported to give significantly higher densities of silver-enhanced gold particles than other methods. An example of the results is shown below:



**Nanogold®:-Fab' goat anti-rabbit IgG** (Catalog # 2004) labeling the  $K^+$  channel Kv2.1 subunit in rat brain, followed by **HQ Silver** (Catalog # 2012) enhancement. Note high density and specificity of immunostaining, even elucidating subunit localization to cytoplasmic side of cell membrane and outer stacks of the Golgi; axons and terminals are clearly negative. Work done by J. Du, J.-H. Tao-Cheng, P. Zerfas, and C. J. McBain, NIH. See *Neuroscience*, **84**, 37-48 (1998). Bar = 1 micron.

|                                                                                   |                                                  |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>        | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage<br/>Nanogold Pre-Embedding</b> | MET B 9   |

## Materials and Reagents

Sodium phosphate buffer: 0.1 M sodium phosphate, pH adjusted to 7.4.

- Phosphate-buffered saline (PBS) buffer: 0.02 M sodium phosphate buffer with 0.15 M sodium chloride, pH adjusted to 7.4.
- Phosphate-buffered saline (PBS) buffer: 0.02 M sodium phosphate buffer with 0.15 M sodium chloride, pH adjusted to 7.4, containing (a) 5 % bovine serum albumin and 0.05 to 0.1 % sodium azide; and (b) 1% goat serum and 0.1% NaN<sub>3</sub> for 3-4 X 5 min
- Glutaraldehyde and paraformaldehyde.
- HQ Silver reagent (Nanoprobes).
- Deionized or distilled water.

## Procedure

1. Fix for ~45 minutes (for monolayer cultures) with one of the following: (1) 4% paraformaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4, or (2) 2% paraformaldehyde with 0.05% - 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4.
2. Wash with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, 3 x 5 min each.
3. Blocking and permeabilize the cells with PBS with 5 % goat serum, 0.1% sodium azide and 0.1% Saponin for 1 hour.
4. Incubate with primary antibody made in PBS with 5% normal goat serum, 0.1% saponin and 0.1% sodium azide for 1 hour at room temp.
5. Wash with PBS with 1% goat serum and 0.1% sodium azide for 3-4 x 5 min.
6. Incubate with Nanogold -labeled Fab' anti-rabbit or mouse (depending on the primary antibody) secondary antibody conjugate ( 4 µl) in 1 ml of PBS with 1% goat serum and 0.1% sodium azide for 1 hr, room temp.
7. Wash with PBS containing 1% goat serum with 0.1% sodium azide, once, then PBS, twice.
8. Fix with 2% glutaraldehyde in PBS for 30 minutes.
9. Wash 3 times in PBS. Store overnight.

### Next day:

10. Wash with water thoroughly.
11. Perform silver enhancement ([HQ Silver](#) enhancement kit, Nanoprobes, NY).
12. Wash in water. Check under LM carefully; only process the promising specimens for EM.
13. Wash in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4.
14. 0.2% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M phosphate buffer for 30 minutes.
15. Wash, stain with uranyl acetate, dehydrate in ethanol, and embed.

|                                                                                   |                                                  |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>        | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage<br/>Nanogold Pre-Embedding</b> | MET B 9   |

## References

1. Tanner, V. A., Ploug, T., and Tao-Cheng, J.-H. Subcellular localization of SV2 and other secretory vesicle components in PC12 cells by an efficient method of preembedding EM Immunocytochemistry for cell cultures. *J. Histochem. Cytochem.*, **44**, 1481-1488 (1996).
  - [Abstract](#) (from [JHC Online](#)).
2. Du, J.; Tao-Cheng, J.-H.; Zerfas, P., and McBain, C. J. The K<sup>+</sup> channel, Kv2.1, is apposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical principal neurons and inhibitory interneurons. *Neuroscience*, **84**, 37-48 (1998).
  - [Abstract](#) (from [Medline](#)).

---

## Procedure using Gold Enhancement

In the Proceedings of [Microscopy & Microanalysis 2001](#), Grondin and Beaudoin report a new pre-embedding immunogold method which gives a very high signal combined with very good ultrastructural preservation. It was demonstrated by labeling NADPase type 1 (a membrane protein) in confluent endothelial cells:

1. Fix cells in situ for 3 hours with a freshly prepared and filtered solution of 1 % l-lysine, 4 % paraformaldehyde, 0.04 % glutaraldehyde and 0.25 % sodium metaperiodate in 0.04 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4.
2. Permeabilize with 50 % methanol at -20°C for 5 minutes.
3. Wash with phosphate-buffered saline containing 0.1 % Tween-20 (PBST).
4. Block unspecific labeling with phosphate-buffered saline containing 0.1 % Tween-20, 2 % goat serum, 1 % bovine serum albumin, 0.45 % fish gelatin, and 0.4 % glycine (PBSB).
5. Incubate at 4°C overnight with primary antibody diluted 1 : 300 in PBSB.
6. Wash three times in PBST.
7. Incubate 1 hour at room temperature with Nanogold-labeled secondary antibody diluted 1 : 300 in PBSB.
8. Wash three times in PBST.
9. Fix 1 hour in 1.2 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, with 5 % sucrose.
10. Wash with water.
11. Enhance using [GoldEnhance LM](#) (6 minutes).
12. Post-fixation in 2 % osmium tetroxide and 2 % potassium ferricyanide in the same buffer.
13. Dehydrate, embed in Epon 812, section and stain with lead citrate before examination in the electron microscope.

Reference:

|                                                                                   |                                                  |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>        | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage<br/>Nanogold Pre-Embedding</b> | MET B 9   |

Grondin, G., and Beaudoin, A. R.: A New Pre-Embedding Immunogold Method that Permits to Obtain a Very High Signal with a Very Good Ultrastructure. *Microsc. Microanal.*, 7, (Suppl. 2: *Proceedings*) (*Proceedings of the Fifty-Ninth Annual Meeting, Microscopy Society of America*); Bailey, G. W.; Price, R. L.; Voelkl, E., and Musselman, I. H., Eds.; Springer-Verlag, New York, NY, **2001**, pp. 1044-1045.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage<br/>Sur cryocoupes</b>  | MET B 10  |

## METHODE DE TOKUYASU

- Rincer 3 x en PBS 1X après fixation
- Incuber 15 min en PBS + NH<sub>4</sub>Cl 50 mM
- Mettre 1 à 2 ml de PBS + Gélatine 1 % et scraper les cellules dans la boîte.
- Centrifuger 25 s les cellules et enlever le max de gélatine 1 %
- Resuspendre les cellules et ajouter rapidement 1 ml de gélatine 12%(à 37°C)
- Laisser incuber 5 min à 37°C.
- Centrifuger rapidement pendant 2 min à 13 000 et enlever le surplus de gélatine.
- Laisser solidifier dans la glace pendant 15 min
- Couper le culot en deux et le mettre 15 min dans sucrose 2,1M (ou 2,3M)
- Couper le culot en petits blocs et les mettre dans le sucrose 2,1M toute la nuit à 4°C
- Mettre les petits blocs sur pins et enlever le surplus de sucrose. Puis plonger les pins dans l'azote. Mettre les pins dans un tube NUNC préalablement troué et ranger dans un conteneur à azote.
- Ultra microtomie à froid (une journée pour 2-3 échantillons)

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Immunomarquage<br/>Sur cryocoupes</b>  | MET B 10  |

## IMMUNOMARQUAGE SUR CRYOCOUCPE

**Incubation en gélatine 2% à 37°C en chambre humide 20 min**

**Blocage des aldéhydes :**

5 x 2 min en PBS + NH<sub>4</sub>CL 50 Mm

**Blocage des protéines :**

5 min en PBS + BSA 1%

**1er Ac primaire :**

Dilué en PBS + BSA 1% 45 min à 1 h

**Lavages :**

5 x 2 min en PBS + BSA 0,1%

PBS + BSA 1% 5 min

**Conjugué à l'or :**

protéine A (si 1<sup>er</sup> anticorps rabbit) en PBS + BSA 1% 20min

**Lavages :**

5 x 2 min en PBS 1X

**Post -fixation :**

1% Gluta en PBS 5 min

**Lavages :**

8 x 2 min en H<sub>2</sub>O

**Contraste :**

metylcellulose/ AU (9:1) sur glace 5 min

Récupérer chaque grille avec une anse de platine et sécher sur papier filtre avec un angle de 90°.

Puis laisser sécher 15 à 20 min.

- Observer au microscope à transmission

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                                              |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                                    | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Les techniques de coloration négatives et les différents contrastants</b> | MET C 1   |

## LES TECHNIQUES DE COLORATION NEGATIVE

### (Différents contrastants)

#### Etapes préliminaires

- Les échantillons sont mis en suspension dans l'eau distillée puis dans un tampon HEPES 10mM (acide N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic) ou dans 1% d'acetate ammonium.
- Le tampon P.B.S. est déconseillé car des résidus de sel contaminent la grille à l'observation et après lavage le contraste est trop faible sous les électrons.
- On peut utiliser des échantillons fixés ou non par exemple dans 2.5% glutaraldehyde dans 0.1M cacodylate de sodium. Après fixation mettre en suspension dans l'eau distillée (laver plusieurs fois pour éliminer les traces du glutaraldehyde) puis dans une solution tampon comme décrit précédemment.

#### Méthode A.

1. Préparer une solution neutre d'**acide phosphotungstique** (dodeca-Tungstophosphoric acid) et ajusté au pH 7,0 avec une solution aqueuse 1M KOH.
2. Mélanger une quantité égale de l'échantillon en suspension avec le colorant (quelques gouttes).
3. Déposer une goutte de ce mélange (colorant – échantillon) sur une grille revêtue d'un support type Formvar ou Collodion durant 30s, puis égoutter à l'aide d'un filtre.
4. Sécher à l'air ou sur une plaque chauffante à 50 – 60°C.
5. De nombreuses méthodes préconisent de laver après séchage de la grille à l'eau distillée. Cette étape est vraiment nécessaire lorsqu'on utilise des tampons qui cristallisent. Cette étape n'est pas toujours nécessaire (un contrôle est nécessaire au Microscope électronique).
6. Observer au E.M.

#### Méthode B.

1. Mettre la suspension cellulaire dans de l'eau distillée ou dans un tampon.
2. Une goutte est déposée sur une grille revêtue d'un support type Formvar ou autre.
3. Lorsque la suspension a partiellement séché sur la grille. Laver par contact avec trois gouttes distinctes d'eau distillée puis sécher sur papier filtre par contact.
4. Déposer une petite goutte du colorant **phosphotungstate de potassium**.
5. Après 10 secondes, l'excès de colorant est éliminé par contact avec un papier filtre.
6. La grille est mise à sécher à température ambiante.
7. Observer au E.M.

|                                                                                   |                                                                              |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                                    | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Les techniques de coloration négatives et les différents contrastants</b> | MET C 1   |

**Methode C.** (*Pour bacterie en culture plate*).

1. Mettre une goutte 1% acetate ammonium 1% sur une lame de verre propre.
2. Déposer une goutte d'échantillon de bacterie sur le tampon ammonium sur la lame, puis mixer.
3. Ajouter une goutte de colorant de préférence **molybdate ammonium** à 1% sur la lame, puis mixer.
4. Déposer une petite goutte de ce mélange échantillon-colorant sur une grille revêtue d'un support durant une minute.
5. Enlever l'excès de cette mixture sur un filtre.
6. Sécher à température ambiante.
7. Observer au Microscope Electronique.

**Remarques**

- Dans de nombreux cas les bactéries sont maintenues dans des tampons PBS (inconvenient cristaux). En substitution préparer d'abord une solution de Phosphotungstate de Potassium 2% dans 0,2% de sucrose dans l'eau. Mélanger dans les proportions respectives (5–1) échantillon–colorant et continuer selon la méthode A au 3<sup>em</sup> point.

**Autres Colorants**

**MOLYBDATE D'AMMONIUM**

Utiliser dans les mêmes cas que phosphotungstate de potassium mais à 1% dans l'eau distillée. Ce colorant donne des résultats aussi bon.

**ACETATE D'URANYL**

Utiliser dans les mêmes cas que phosphotungstate de potassium mais à 1% dans l'eau. Ce colorant donne des résultats plus fins mais un contrast moindre. Il est utilisé surtout pour mettre en évidence de petites particules.

**TUNGSTATE METHYL-AMINE**

Utiliser dans les mêmes cas que phosphotungstate de potassium, mais à 2% dans l'eau distillée à pH 6,5 final.

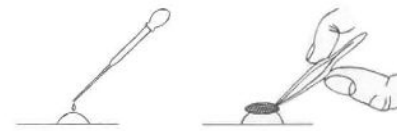
[Document référence](#) (Université Bristol UK)

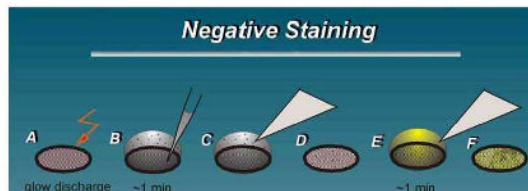
**Coloration négative**

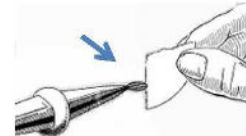
**Préparation Contrastant**

Bien dissoudre 1gr d'acétate d'uranyle dans l'eau.

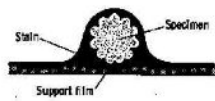
Filtrer avec un filtre seringue de 0,2 $\mu$   
Stocker à l'abri de la lumière


  
 → Mettre au contact votre grille face Carbonée et ionisée sur une goutte de votre échantillon (1mn)




  
 Égoutter avec un papier filtre

Contraster à l'acétate d'uranyle 1% (1mn)


  
 Observer


  
 Égoutter avec un papier filtre

1

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>     | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Coloration des coupes semi-fines en ME</b> | MET D 1   |

- **Principe:** les coupes semi-fines incluses en epon ne prennent pas les colorants usuels, il faut donc avoir recours a des techniques de coloration adaptées au milieu d'inclusion
- **Matériel:** Les coupes semifines (1 micron) sont recueillies dans une goutte d'eau distillée, déposée sur une lame de verre, sur une platine chauffante à 60°. Il faut les laisser sécher au moins 5mn pour éviter leur décollement
- **Méthode:**

**"Monochrome" bleu:**

1. Lame sur la platine chauffante 60°
2. Filtrer directement sur les coupes un mélange de:

**1 g de bleu de toluidine**  
**1 g de bleu de méthylène**  
**1 g de borax**  
**QSP 100 ml Eau distillée**

1. Rincer abondamment (disparition des traces de colorant) à la pissette d'eau distillée
2. Laisser sécher quelques minutes sur la platine
3. Contrôler au microscope: si trop pâle, on peut recommencer l'opération, en cas de sur-coloration il est difficile d'enlever l'excès de colorant (utiliser de l'alcool faible)
4. Monter entre lame et lamelle après un bref passage dans le toluène

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                  |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>        | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Protocole contraste des coupes Ultrafines</b> | MET D 2   |

### **Mode opératoire :**

#### **Matériel:**

Une seringue 1ml et une aiguille rose (18G 1 1/2”), une seringue 10ml, deux filtres 0,22µm, papier filtre, feuilles de parafilm, couvercles de boîte de Pétri, pince crochue, eau distillée

#### **Solution:**

Acétate d’uranyle aqueux à 4% (solution saturée à 4,8%). La solution doit être préparée à l’avance (48 à 72h avant utilisation) dans un flacon brun ou à l’abri de la lumière (flacon enveloppé de papier aluminium). Conserver en flacon bien bouché à +4°C.

#### **Protocole d’utilisation :**

Les feuilles de parafilm sont « immobilisées » sur la paillasse à l’aide de quelques gouttes d’eau distillée. Des gouttes de solution d’acétate d’uranyle filtrée (membrane de 0,22µm) sont déposées sur une feuille de parafilm et rapidement recouvertes d’un couvercle de boîte de Pétri puis mises à l’abri de la lumière.

Les grilles sont d’abord réhydratées à la surface d’une goutte d’eau distillée, filtrée et déposée sur le parafilm, elles sont débarrassées de l’excès d’eau puis contrastées pendant 10 à 30 minutes sur une goutte d’acétate d’uranyle à l’abri de la lumière.

Ne pas faire trop de grilles à la fois car le lavage après contraste demande du temps. Pour cela, déposer une dizaine de gouttes d’eau distillée sur le parafilm puis déposer successivement les grilles dans toutes les gouttes d’eau distillée (prendre garde aux traces de solution qui peuvent rester entre les mors des pinces).

Faire sécher soigneusement les grilles sur du papier filtre (30 min) avant de procéder au contraste au citrate de plomb ou d’observer au ME.

Enlever les gouttes d’acétate d’uranyle et d’eau de rinçage à l’aide d’une seringue les jeter dans le récipient de déchets chimiques.

**Consignes générales de sécurité:** L’acétate d’uranyle est toxique au contact de la peau, des yeux et des voies respiratoires. En conséquence, le produit est à manipuler en portant des gants, des lunettes de protection ainsi qu’un masque de protection.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryofixation et Cryosubstitution levures</b> | MET E 1   |

## Fixateur

Fixateur Antony :      glutaraldéhyde dans l'acétone [0,1%] finale  
                                  OsO<sub>4</sub> dans l'acétone [0,01%] finale  
                                  acétate d'urane dans le méthanol [0,1%] finale

Ce jour : 2 x 25 ml de fixateur Antony      250 µl de gluta 10% dans l'acétone [0,1%] finale  
                                                                  125 µl d'OsO<sub>4</sub> à 2% dans l'acétone [0,01%] finale  
                                                                  500 µl d'urane à 5% dans le méthanol [0,1%] finale  
                                                                  pour 25 ml d'acétone

Du fixateur est mis à refroidir dans le cryosubstituteur

## Mise en route des appareils

*Cryosubstituteur :*

Mise en place du long tube noir central

Remplissage du cryosubstituteur avec de l'azote liquide.

On monte la température à +20°C et on la programme ensuite à -90°C.

*Cryofixateur :*

Avant de mettre en marche l'appareil, penser à ajouter du cyclo-hexane par le petit hublot.

Faire un "Bake" pendant 2 à 3 heures pour sécher l'appareil.

|                                                                                   |                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryofixation et Cryosubstitution levures</b> | MET E 1   |

## Mise en place des porte-gélules et des gélules percées

### *Porte-gélules :*

Installer la cheminée métallique centrale dans un porte-gélules en faisant attention à son orientation pour assurer un bon écoulement des liquides.

Placer les porte-gélules dans le cryofixateur.

Distribuer le fixateur RT dans les porte-gélules du cryosubstituteur lorsqu'il est à  $-90^{\circ}\text{C}$ .

Refroidir les gélules percées dans un petit portoir métallique à part placé dans le cryosubstituteur?

Lorsque les gélules sont refroidies elles sont plongées dans le fixateur contenu dans le porte-gélule.

## Cryofixation

1 ml de culture dans un eppendorf incubé au bain marie pour le choc thermique

Centrifuger 10 sec sur une petite centrifugeuse de paillasse

Récupérer l'équivalent d'une pointe de pipetman du culot et sous la loupe binoculaire, remplir la cupule avec cet échantillon en formant un ménisque.

A l'aide des grandes pinces oranges, tremper la cupule contenant l'échantillon dans l'héxadécène

Placer la cupule dans le porte-objet.

Placer le porte objet sur le cryofixateur.

Procéder à la cryofixation.

Les petites cupules de cuivre avec l'échantillon cryofixé sont transférées dans l'azote liquide et placées dans les gélules percées remplies de fixateur à  $-90^{\circ}\text{C}$  au sein du cryosubstituteur.

On laisse dans le fixateur (110h) c'est à dire jusqu'au 4 Avril au matin.

Vider le surplus d'azote du cryofixateur et faire un "bake" avant d'éteindre l'appareil.

|                                                                                   |                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryofixation et Cryosubstitution levures</b> | MET E 1   |

## Cryosubstitution

Remplir le cryosubstituteur d'azote (en cas de besoin).

Placer de l'acétone pur dans le cryosubstituteur de façon à le refroidir.

11h00-Substituer le fixateur par cet acétone lorsqu'il est froid (à 11h).

11h30- nouveau bain d'acétone pur préalablement refroidi et programmation de la remontée pour avoir  $-50^{\circ}\text{C}$  le lendemain matin ( $5^{\circ}\text{C}$  par heure).

Mardi matin : transfert des échantillons sous la loupe binoculaire

On manipule dans la chambre à cryocoupes que l'on refroidit préalablement  $-50^{\circ}\text{C}$  (brancher la bouteille d'azote)

Placer deux salières en cristal dans le fond de cette chambre. Les remplir d'acétone pur.

Sortir un porte-gélules du cryosubstituteur et le transférer au centre du cryomicrotome.

Les cupules de cuivre sont sorties des gélules percées et placées dans une salière contenant l'acétone. Les gélules vides sont remises en place.

Les échantillons sont divisés en deux en s'aidant d'une grande aiguille montée et en tenant la cupule avec les pinces oranges.

Les échantillons sont distribués dans les gélules percées à l'aide d'une pipetman de  $200\text{ }\mu\text{l}$  avec un embout coupé à son extrémité.

Le porte gélules est transféré à nouveau dans le cryosubstituteur.

La chambre du cryotome est mise en "bake" (appuyer dur H)

|                                                                                   |                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>       | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryofixation et Cryosubstitution levures</b> | MET E 1   |

### **Imprégnation**

Remplacer l'acétone par de l'éthanol 100% préalablement refroidi.

1<sup>er</sup> bain HM20/EtOH [1/1] préalablement refroidi pendant 1 h

2<sup>ème</sup> bain HM20/EtOH [2/1] préalablement refroidi pendant 2h

3<sup>ème</sup> bain résine pure préalablement refroidie 2 x 1 h

Incubation sur la nuit.

Changements de bain de résine préalablement refroidie (à 11h et à 16h).

Renouvellement du bain avec la résine préalablement refroidie

Placer les gélules en gélatine dans un portoir intermédiaire. Placer l'ensemble dans le cryosubstituteur.

Une fois froids, les gélules de gélatine sont remplies de résine HM20 préalablement refroidie.

A l'aide de la anse araignée maintenue avec un tourne-vis, les gélules percées contenant le matériel biologique et de la résine sont transférées dans les gélules en gélatine (attention à la position sur le portoir araignée) dans le portoir intermédiaire.

Placer les gélules en gélatine tenues par l'araignée sur une potence placée dans une cuve métallique.

Mettre de l'alcool EtOH dans le fond de la chambre en cas de débordement de résine.

Remplacer **le tube noir par le rouge**.

Abaissier la vitre de verre.

Placer la lampe à U.V.

Programmation :

48h -50°C

remontée, 6°C par heure pendant 11h

T2 = 12h à +20°C

S2 = 0

T3 = 12h à +20°C

Lampe mise en marche 1h après le transfert des gélules.

Lundi matin

Sortir les échantillons

Faire un "bake" du cryosubstituteur (60°C, 48h, vitres ouvertes, tube long noir).

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryosubstitution</b>                   | MET F 1   |

### 1- Fixation:

*Les échantillons utilisés sont fixés dans du paraformaldéhyde 2.5%+glutaraldehyde 0.1% pendant 1h à température ordinaire.*

*Les échantillons sont lavés immédiatement après la fixation dans 2 bains de tampon phosphate 0.1M contenant de la glycine 0.1M 2x5min et enrobés dans la gélatine alimentaire 10%.*

Remarques: - *Le temps de fixation varie en fonction de la nature et de l'épaisseur de l'échantillon.* - *le type de tampon utilisé dépend de l'objectif de l'étude envisagée.*

### 2- Congélation:

*Les échantillons sont ensuite cryo-protégés dans du sucrose 2.3M pendant 2h à température ordinaire à l'abri de la lumière et congelés dans l'azote liquide.*

Remarque: *Inutile de conserver plus longtemps dans le sucrose.*

### 3- Inclusion à basse température:

#### *A- Déshydratation :*

*Méthanol pur : 12-24h à -90°C*

*Méthanol pur : 6h à -60°C*

*Méthanol pur : 6h à -40°C*

Remarque: *Penser à utiliser le bon insert à chaque changement de température.*

Mode opératoire

- *Les échantillons sont transportés dans l'azote jusqu'à l'automate de cryosubstitution.*

- *Placer les flacons en plastique de déshydratation à fond perforé(51) (préalablement numérotés) sur la plaque de base(52) et les installer dans la cuve métallique pour capsules (50) dans la chambre à -90°C.*

- *Placer deux autres cuves métalliques dans la chambre; une sera remplie de méthanol et la seconde contiendra les milieux de lavages. Quand tout est à -90°C, mettre du méthanol dans les flacons de déshydratation, y placer les échantillons et démarrer le programme de déshydratation.*

#### *B- Substitution:*

|                       |             |              |                      |
|-----------------------|-------------|--------------|----------------------|
| <i>Methanol: K4M</i>  | <i>1/1</i>  | <i>-40°C</i> | <i>2h</i>            |
| <i>Methanol : K4M</i> | <i>2/1</i>  | <i>-40°C</i> | <i>2h</i>            |
| <i>K4M</i>            | <i>pure</i> | <i>-40°C</i> | <i>2h</i>            |
| <i>K4M</i>            | <i>pure</i> | <i>-40°C</i> | <i>toute la nuit</i> |

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryosubstitution</b>                   | MET F 1   |

Inclusion à plat : les bains d'imprégnation s'effectuent dans les mêmes flacons à fond perforé jusqu'à l'étape de polymérisation.

Inclusion dans les capsules : placer les capsules «Leica» perforées dans la chambre correspondante, placer le cylindre de remplissage dans le sens des encoches vers le bas. Remplir la chambre de milieu d'inclusion par le cylindre, placer les échantillons dans les capsules. Effectuer tous les bains dans cette chambre en utilisant le cylindre de remplissage. Placer la chambre de capsules de gélatine dans l'AFS.

**Remarque:**

*Pour l'inclusion à plat les moules sont numérotés, il suffit de reporter la correspondance aux échantillons. On peut aussi placer une étiquette dans les moules. Pour l'inclusion en capsule, la chambre des capsules Leica ainsi que les couvercles araignée ont une encoche qui permet de se repérer lors de l'installation des échantillons. Noter sur son cahier le sens de la numérotation par rapport à l'encoche et reporter la correspondance aux échantillons*

## C- Polymérisation

Lowicryl K4M- 40°C pendant 48h sous UV

*Utiliser l'insert rouge de polymérisation.*

Mode opératoire: Pendant la préparation des échantillons mettre le programme sur Pause et le flux d'azote sur maximum.

a- Inclusion à plat: - Déposer un petit volume de K4M dans le moule, aspirer l'échantillon avec une goutte de milieu d'inclusion à l'aide d'une pipette jetable et le transférer dans le moule. Bien placer l'échantillon à une extrémité du moule, recouvrir avec la résine, aspirer l'excès de milieu et couvrir. Déposer une goutte de milieu sur le rebord de l'unité d'inclusion pour assurer l'étanchéité avec le couvercle.

**Remarques :**

- 1- Ne pas trop remplir, le débordement rendra difficile le démoulage.*
- 2- Bien assurer l'étanchéité entre le couvercle en plastique et le moule à plat afin d'éviter l'entrée d'air. L'air piégé dans les moules gênera la polymérisation.*

b-Inclusion en capsules: Remplir les capsules de gélatine de milieu d'inclusion, bien fermer les capsules Leica à l'aide des couvercles araignée, transporter ces capsules à l'aide du cryomanipulateur et les placer dans les capsules de gélatines. Mettre un petit volume d'éthanol dans la chambre de capsules de gélatine qui augmentera l'efficacité de la polymérisation. Une fois les échantillons à plat et/ou en capsules sont prêts, fermer le couvercle coulissant, abaisser la plaque de verre amovible sur l'insert T, la désolidariser du manchon en dévissant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, relever le manchon et ouvrir le couvercle. Installer la lampe UV, allumer la et lancer le programme de polymérisation. **Le cycle de la polymérisation est lancé.**

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryosubstitution</b>                   | MET F 1   |

#### D- Fin de la polymérisation et démoulage :

*Réchauffer le milieu d'inclusion à la température ambiante sans UV (programme 4), chauffage 1h à 25°C. Sortir l'unité d'inclusion à plat, enlever le couvercle et dévisser le moule du support. S'il n'y a pas eu débordement ou autre problème, il suffit d'exercer une pression sur le côté ne contenant pas les échantillons. S'il y a résistance, appliquer un choc thermique par passage à +4°C (frigo) ou à -20°C (congélateur ou AFS), au passage à température ambiante le plastique se rétracte et les échantillons seront séparés facilement.*

#### Remarques:

- 1- Si la polymérisation n'est pas complète, exposer les échantillons aux UV du soleil.*
- 2- Les blocs contenant les échantillons peuvent se colorer en rose, ne pas s'en inquiéter, il suffit de mettre les échantillons à l'abri de la lumière après la fin de la polymérisation et la coloration disparaît.*
- 3- Dès disparition de la coloration, il est inutile de les conserver dans le noir.*

Programmation cryosubstitution: *En deux fois*

Programme N°1 déshydratation dans méthanol pur

*T1 : - 90°C 24h*

*S1 : 6°C/h 5h*

*T2 : - 60°C 6h*

*S2 : 6°C/h 3.3h*

*T3 : - 40°C 6h*

*Durée totale programme 1 (déshydratation) : 44.3h*

Programme N°2 imprégnation et inclusion

*T1 : - 40°C 3x2h (2h méthanol/K4M 1/1, 2h méthanol/K4M 1/2, 2h K4M pure)*

*S1 : 0*

*T2 : - 40°C K4M pure toute la nuit (12h)*

*S2 : 0*

*T3 : - 40°C 48h Polymérisation sous UV*

*Durée totale du programme 2 (imprégnation, inclusion) : 66h*

*Durée des programmes 1 +2 = 110,3h*

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                                        |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                              | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Inclusion à basse température (PLT progressive low température)</b> | MET F 2   |

### 1- Fixation:

- Fixer dans du paraformaldéhyde 2.5%+0.1% pendant 1h à température ordinaire.
  - Laver immédiatement après la fixation dans 2 bains de tampon phosphate 0.1M contenant de la glycine 0.1M 2x5min
  - Immobiliser dans l'agarose 2% (agarose low melting Euromedex), si besoin.
  - Post-fixer dans l'acétate d'uranyl 0.5% en solution aqueuse pendant 30 min
- On part d'une solution mère d'acétate d'uranyl à 4% dans l'eau qui est alors à pH acide. Diluer à 1% et ajuster à pH 7 soit avec une solution d'acétate d'oxalate 0.15M (Tokoyasu l'utilise à 0.3M); il faut ajouter cette solution petit à petit dans les proportions 1/1 soit Ajuster à pH 7.5 avec l'ammonium 25% (NH<sub>4</sub>OH) (Tokoyasu l'utilise à 5%). Utiliser du papier pH pour ne pas saturer l'électrode avec le métal lourd.

### 2- Déshydratation:

- |                  |       |       |
|------------------|-------|-------|
| - Ethanol 30%    | 0°C   | 30min |
| - Ethanol 50%    | -20°C | 1h    |
| - Ethanol 75%    | -30°C | 1h    |
| - Ethanol absolu | -30°C | 1h    |
| - Ethanol absolu | -30°C | 1h    |

### 3- Inclusion:

- |                   |       |               |
|-------------------|-------|---------------|
| - Ethanol/K4M 1/1 | -30°C | 1h            |
| - Ethanol/K4M 1/2 | -30°C | 1h            |
| - K4M pure        | -30°C | 1h            |
| - K4M pure        | -30°C | toute la nuit |

### 4- polymérisation:

48h sous UV à -30°C

Programmation PLT:

Commencer par mettre en route le programme N°0 de dégivrage: T1 : +50°C pdt 0.2h

Programme N°3

T1 : 0°C 30 min (éthanol 30%)

S1 : -20°C/h 1h Prévoir une minuterie pour les bains suivants

T2 : -20°C 1h (1h éthanol 50%, 1h éthanol 75%, 1h éthanol 100%, 1h éthanol 100%)

S2 : -10°C/h 1h Prévoir une minuterie pour les bains suivants

T3 : -30°C 60h (1h éthanol/K4M 1/1, 1h éthanol/K4M 1/2, 1h K4M pure, toute la nuit K4M pure, 48h sous UV polymérisation) Durée totale de l'inclusion 79.5h

Remarque: 1- Pour le protocole expérimental d'inclusion, procéder comme pour la cryosubstitution.

- Programme N°4 : Chauffage à +25°C 1h après la fin de la polymérisation et avant de retirer les échantillons de l'AFS.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                              |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                    | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Unicryl sous UV à -20°C après enrobage dans de l'agar</b> | MET F 3   |

### 1°) Fixation

Première fixation (2h à 4°C)

- PFA à 4%
- Glutaraldéhyde à 0.1%
- Sorensen 0.1M

Deuxième fixation (à 4°C pour conserver l'échantillon plusieurs jours)

- PFA à 4%
- Sorensen 0.1M

### 2°) Lavage

| Produits                           | Osmolarité      |
|------------------------------------|-----------------|
| Solution de Sorensen pH=7.4, 0.2 M | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>           | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12h à 4°C*

### 3°) Pré-inclusion en gélose

Enrobage dans de l'agar LMP :

- Agar LMP à 1.5% liquide à ~ 40°C

### 4°) Déshydratation alcoolique

| Bains d'alcool     | Temps   |
|--------------------|---------|
| alcool 50° à 4°C   | 3x5 mn  |
| alcool 70° à -20°C | 2x15 mn |
| alcool 90° à -20°C | 2x20 mn |
| alcool 95° à -20°C | 3x20 mn |

### 5°) Substitution

| Mélange résine               | Temps | Température |
|------------------------------|-------|-------------|
| Unicryl 1/3 – alcool 95° 2/3 | 30 mn | - 20 °C     |
| Unicryl 2/3 – alcool 95° 1/3 | 30 mn |             |
| Unicryl pur                  | 1h    |             |
| Unicryl pur                  | 12h   |             |

|                                                                                   |                                                              |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                    | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Unicryl sous UV à -20°C après enrobage dans de l'agar</b> | MET F 3   |

#### **6°) Inclusion et polymérisation sous UV à froid**

- Unicryl pur : 1 mn
- Unicryl pur : 48h à -20°C sous UV

#### **7°) Coupes**

#### **8°) Coloration**

- Acétate d'uranyle 3% dans l'éthanol 50% : 2 mn
- Citrate de plomb 8.5% : 10 mn

#### **9°) Observation au MET**

|                                                                                   |                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>             | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryo-stockage des échantillons pour cryocoupes</b> | MET G 1   |

## 1) Fixation

### *a) Première fixation*

| Produits                   | Concentration finale |
|----------------------------|----------------------|
| Paraformaldéhyde 16%       | 4%                   |
| Glutaraldéhyde 25%         | 0.1%                 |
| Tampon Sorensen 0.2M       | 0.1M                 |
| H <sub>2</sub> O distillée | qsp                  |

Durée : 1h à température ambiante

### *b) Deuxième fixation*

| Produits                   | Concentration finale |
|----------------------------|----------------------|
| Paraformaldéhyde 16%       | 0.4%                 |
| Tampon Sorensen 0.2M       | 0.1M                 |
| H <sub>2</sub> O distillée | qsp                  |

Durée : peut rester plusieurs jours dans ce fixateur, conserver à 4°C

## 2) Lavage

Durée : 3 x 5min dans du tampon Sorensen, à température ambiante

Si cellules en culot, les enrober dans de l'agarose Low Melting Point (2% dans l'eau) puis les couper en petits blocs de 1mm<sup>3</sup>.

## 3) Blocage des aldéhydes libres

| Produits                   | Concentration finale |
|----------------------------|----------------------|
| Glycine                    | 50mM                 |
| Tampon Sorensen 0.2M       | 0.1M                 |
| H <sub>2</sub> O distillée | qsp                  |

Durée : 5 min, à température ambiante

## 4) Cryoprotection

| Produits                   | Concentration finale |
|----------------------------|----------------------|
| Sucrose                    | 2.3M                 |
| Tampon Sorensen 0.2M       | 0.1M                 |
| H <sub>2</sub> O distillée | qsp                  |

Durée : 2h minimum à une nuit, à 4°C, sous agitation

## 5) Congélation de l'échantillon

|                                                                                   |                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>                 | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryo-stockage des échantillons pour<br/>cryocoupes</b> | MET G 1   |

Monter l'échantillon sur un clou en enlevant le maximum de sucrose (pour la peau : laisser du sucrose autour de l'échantillon)

Plonger le clou avec l'échantillon dans l'azote liquide en agitant pendant quelques secondes pour éviter la formation de cristaux

#### **6) Stockage des échantillons**

Après congélation, mettre les clous dans un tube cryogénique préalablement percé afin d'éviter son explosion et identifié. Stocker dans le dewar de conservation contenant de l'azote liquide.

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryoultramicrotome</b>                 | MET G 2   |

### 1) Préparation du cryoultramicrotome

Remplir le Dewar d'azote liquide (40 à 50 cm)  
Allumer la commande tactile au moyen de l'interrupteur situé derrière l'appareil  
Allumer les deux boîtiers situés sous la table (boîtiers pour la cryo et pour l'antistatique)  
Abaisser la pompe dans le Dewar sans la déposer entièrement. Attendre la fin du bouillonnement puis l'insérer complètement.  
Raccorder le tuyau LN2 à l'enceinte cryostatique et à la pompe (ouvrir l'obturateur de sécurité)  
Appuyer sur Start sur l'écran tactile  
Sélectionner les températures des couteaux, de l'échantillon et de la chambre. Pour le trimming, -80°C pour tous les trois

### 2) Préparation de l'enceinte cryostatique pendant la descente en température

Insérer et fixer le porte-échantillon dans le bras support d'échantillon (fixer de préférence à la position 0°)  
Insérer et fixer les couteaux dans le porte-couteau. Vérifier l'angle de dégagement (en général 6°)  
Déposer le porte-couteau dans l'enceinte cryostatique. Insérer le trou du porte-couteau dans la broche de la platine à couteau de l'enceinte cryostatique

### 3) Dépôt de l'échantillon dans la chambre cryostatique

Sortir le tube cryogénique contenant les échantillons d'intérêt du dewar d'azote et récupérer un clou. Remettre ensuite le tube dans le dewar.  
Lorsque la température s'est stabilisée à -80°C, transférer le clou dans l'enceinte cryostatique à l'aide d'un capuchon rempli d'azote.  
Disposer le clou dans le porte-échantillon (penser à l'orientation de l'échantillon), de préférence en position 0.

### 4) Trimming de la pyramide

Choisir le couteau de trimming en tournant le porte-couteau jusqu'au couteau de trimming.  
Tourner jusqu'à arriver en buter. Visser le porte-couteau  
Avancer le couteau. Débloquer la molette sur le côté de la chambre et pousser le bouton gris situé devant la chambre jusqu'au bout pour approcher le couteau au maximum  
Faire l'approche du couteau avec la molette N/S  
Mettre l'antistatique à 100%  
Sélectionner la vitesse de coupe à 80mm/s et l'épaisseur des coupes à 500nm et commencer les coupes en appuyant sur start/stop  
Pour choisir une épaisseur de coupe totale, sélectionner Counter ▼ en appuyant sur Set  
Possibilité de mesurer la taille de l'échantillon grâce à Counter ↔  
Lorsque que la surface est lissée, définir la taille de l'échantillon finale (environ 200µm) Si vous taillez les côtés avec une épaisseur de coupe totale de 50µm, prévoir un décalage d'environ 50µm de chaque côté. Ex : si pyramide de 200µm se mettre à 250µm pour faire le

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryoultramicrotome</b>                 | MET G 2   |

côté. Si vous taillez les côtés avec une épaisseur totale de 100  $\mu\text{m}$ , prévoir une marge d'environ 120  $\mu\text{m}$ .

Après le trimming d'un des côtés, penser à reculer le couteau avant de passer à l'autre côté

Penser à faire un reset pour l'avance du bloc avant son approche totale

Lorsque la surface et les côtés sont taillés, dévisser le porte-échantillon et le tourner de 90° (position 9 du porte-échantillon). Penser à reculer le couteau avant de tourner l'échantillon

Tailler les côtés de la même façon que précédemment

Reculer le couteau de trimming avec la molette N/S puis avec la molette sur le côté de la chambre et le bouton gris situé devant la chambre

Remettre l'échantillon à sa position initiale (normalement position 0)

Choisir le couteau cryo-ultrafine en tournant le porte-couteau jusqu'à arriver en buter. Visser le porte-couteau

Remarques :

Penser à refroidir les outils, les cils, ... avant de toucher le couteau ou l'échantillon

Nettoyer le couteau avec un cil ou une pipette en plastique par aspiration/refoulement

## 5) Coupes ultrafines

Sélectionner les températures du couteau, de l'échantillon et de la chambre : -120°C pour tous les trois

Attendre que les températures se stabilisent

Préparer une solution contenant 50% sucrose à 2.3M et 50% de méthylcellulose à 2%. Placer cette solution sur de la glace

Avancer le couteau. Débloquer la molette sur le côté de la chambre et pousser le bouton gris situé devant la chambre jusqu'au bout pour approcher le couteau au maximum

Faire l'approche du couteau avec la molette N/S

Mettre l'antistatique à 50%

Sélectionner la fenêtre de coupe : positionner le bas du bloc au-dessus du couteau puis sélectionner Start dans la fenêtre de coupe de l'écran tactile, positionner le haut du bloc au niveau du couteau puis sélectionner End dans la fenêtre de coupe de l'écran tactile

Vitesse de coupe : Medium

Sélectionner la vitesse de coupe à 1mm/s et l'épaisseur des coupes à 60nm et commencer les coupes en appuyant sur start/stop

Lorsque le couteau coupe toute la surface du bloc, faire un ruban de coupes en tirant délicatement avec un cil

Pour récupérer le ruban, se mettre au plus faible grossissement de la loupe binoculaire, éteindre et éloigner l'antistatique

Prélever avec une boucle une goutte d'une solution contenant 50% sucrose à 2.3M et 50% de méthylcellulose à 2%

Approcher rapidement la boucle de l'échantillon. Lorsque les bords de la goutte commencent à geler, effleurer les coupes et les sortir rapidement de la cuve. Ne surtout pas toucher le couteau avec la boucle

Dès que la goutte est dégélée, la placer sur une grille Ni carbonée

Conserver les coupes à +4°C (conservation environ 1 semaine)

## 6) Arrêt de l'appareil

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Cryoultramicrotome</b>                 | MET G 2   |

Lorsque les coupes sont finies, reculer le couteau cryo avec la molette N/S puis avec la molette sur le côté de la chambre et le bouton gris situé devant la chambre  
 Eteindre et enlever l'antistatique  
 Mettre le porte-couteau en position intermédiaire  
 Appuyer sur Pump puis confirmer l'arrêt de la pompe  
 Enlever et passer sous l'eau du robinet le porte-échantillon et le porte couteau (avec les couteaux encore dessus). Faire un lavage final à l'eau distillée  
 Enlever le tuyau d'arrivée de l'azote de la chambre et du Dewar  
 Enlever la pompe du Dewar d'azote et refermer le Dewar avec son bouchon  
 Appuyer sur Heat pour nettoyer la chambre. Ne pas laisser la loupe au-dessus de la chambre et ne pas mettre le cache tant que la chambre chauffe  
 Nettoyer minutieusement les couteaux avec de l'alcool 50° à l'aide de bâtonnets de polystyrène  
 Démonter le porte-échantillon et faire sécher  
 Faire sécher le porte-couteau  
 Lorsque l'appareil est revenu à température ambiante, éteindre les deux boîtiers sous la table et la commande tactile  
 Mettre le cache sur la chambre  
 Mettre les protections sur l'appareil et la commande tactile

|                                                                                   |                                                      |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>            | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de tissus dans le tampon SORENSEN</b> | MEB A 1   |

### 1°) Fixation

| Produits                              | Concentration finale | Osmolarité      |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 volume Glutaraldéhyde à 4 %         | 2 %                  | 200 mOsM        |
| 1 volume de Sorensen, pH = 7.4, 0.2 M | 0.1 M                | 200mOsM         |
| <i>Osmolarité totale</i>              |                      | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 1h à 4°C*

Les tissus sont découpés

### 2°) Lavage

| Produits                           | Osmolarité      |
|------------------------------------|-----------------|
| Solution de Sorensen pH=7.4, 0.2 M | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>           | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimum.*

### 3°) Déshydratation

| Bains d'alcool | Temps     |
|----------------|-----------|
| alcool 30°     | 10 mn     |
| alcool 50°     | 10 mn     |
| alcool 70 °    | 10 mn     |
| alcool 95°     | 10 mn     |
| alcool 100°    | 3 X 15 mn |

### 4°) Dessiccation

Point critique

### 5°) Métallisation

1.2 volt, 10 mA, durée 3 à 4 mn ( $100 \text{ Å.mn}^{-1}$ )

|                                                                                   |                                                        |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>              | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de tissus dans le tampon cacodylate</b> | MEB A 2   |

### 1°) Fixation

| Volume | Produits                | Concentration finale | Osmolarité |
|--------|-------------------------|----------------------|------------|
| 2 vol  | Glutaraldéhyde à 4 %    | 2 %                  | 200 mOsM   |
| 1 vol  | Cacodylate, pH=7.4 0.4M | 0.1 M                | 200mOsM    |
| 1 vol  | H2O Dist.               |                      |            |

*Durée : 4h à 4°C*

### 2°) Lavage

| Produits                 | Concentration finale | Osmolarité      |
|--------------------------|----------------------|-----------------|
| Cacodylate pH=7.4, 0.2 M | 0.2 M                | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i> |                      | <i>418 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 4 bains minimum.*

### 3°) Déshydratation

| Bains d'alcool | Temps     |
|----------------|-----------|
| alcool 30°     | 10 mn     |
| alcool 50°     | 10 mn     |
| alcool 70 °    | 10 mn     |
| alcool 95°     | 10 mn     |
| alcool 100°    | 3 X 15 mn |

### 4°) Dessication

Point critique

### 5°) Métallisation

1.2 volt, 10 mA, durée 3 à 4 mn ( $100 \text{ \AA} \cdot \text{mn}^{-1}$ )

|                                                                                   |                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b> | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de coupes de dents</b>     | MEB A 3   |

### 1°) Fixation

| Produits                            | Osmolarité      |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1 volume Glutaraldéhyde à 4 %       | 200 mOsM        |
| 1 volume de Sörensen pH = 7,4, 0,2M | 200 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>            | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 4h à 4°C*

### 2°) Lavage

| Produits                        | Osmolarité      |
|---------------------------------|-----------------|
| 1 volume Sörensen 0,2M (pH 7,4) | 400 mOsM        |
| <i>Osmolarité totale</i>        | <i>400 mOsM</i> |

*Durée : 12 h à 4°C, 5 bains minimum.*

### 3°) Déshydratation

| Bains d'alcool | Temps      |
|----------------|------------|
| alcool 30°     | 10 min     |
| alcool 50°     | 10 min     |
| alcool 70°     | 10 min     |
| alcool 80°     | 10 min     |
| alcool 90°     | 10 min     |
| alcool 100°    | 3 x 15 min |

### 4°) Dessication

Bains d'Hexamethyl 1.1.1.3.3.3 disilazane pur  
durée 20 min

### 5°) Métallisation

1.2 volt, 10 mA, durée 3 à 4 mn ( $100 \text{ Å.mn}^{-1}$ )

|                                                                                   |                                            |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>  | Indice 01 |
|                                                                                   | <b>Préparation de cultures cellulaires</b> | MEB A 4   |

### 1°) Fixation

Glutaraldéhyde

*Durée : 1h minimum à 4°C*

### 2°) Lavage

Tampon cacodylate

*Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimum.*

### 3°) Post fixation

Osmium OsO<sub>4</sub>

*Durée : 1 h à T° ambiante*

### 4°) re Post fixation

Ac tanique

*Durée : 1h à T° ambiante à l'abri de la lumière*

### 5°) lavage rapide

Cacodylate

### 7°) Déshydratation

| Bains d'alcool | Temps     |
|----------------|-----------|
| alcool 30°     | 10 mn     |
| alcool 50°     | 10 mn     |
| alcool 70 °    | 10 mn     |
| alcool 80°     | 10 mn     |
| alcool 90°     | 10 mn     |
| alcool 100°    | 3 X 15 mn |

### 8°) Dëssication

### 9°) Métallisation

|                                                                                   |                                    |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------|
|  | Protocole Microscopie Electronique | Indice 01 |
|                                                                                   | Cryopanning                        | MEB B1    |

## 1) Fixation

| Produits                  | Concentration finale |
|---------------------------|----------------------|
| Glutaraldéhyde à 4%       | 2 %                  |
| Sörensen, pH = 7.4, 0.2 M | 0.1 M                |
| <i>Osmolarité totale</i>  |                      |

Durée : 4h à 4°C

## 2) Préparation du cryoultramicrotome

Remplir le Dewar d'azote liquide (40 à 50 cm)

Allumer la commande tactile au moyen de l'interrupteur situé derrière l'appareil

Allumer les deux boîtiers situés sous la table (boîtiers pour la cryo et pour l'antistatique)

Abaissier la pompe dans le Dewar sans la déposer entièrement. Attendre la fin du bouillonnement puis l'insérer complètement.

Raccorder le tuyau LN2 à l'enceinte cryostatique et à la pompe (ouvrir l'obturateur de sécurité)

Appuyer sur Start sur l'écran tactile

Sélectionner les températures du couteau, de l'échantillon et de la chambre. Pour le trimming, -80°C pour tous les trois

## 3) Préparation de l'enceinte cryostatique pendant la descente en température

Insérer et fixer le porte-échantillon spécifique pour les plots du cryo-MEB dans le bras support d'échantillon

Insérer et fixer les couteaux dans le porte-couteau (couteaux trimming + cryo-histo). Vérifier l'angle de dégagement (en général 6°)

Déposer le porte-couteau dans l'enceinte cryostatique.

## 4) Préparation de l'échantillon et congélation de l'échantillon

Incuber les échantillons dans un bain de glycérol 20% pendant 1h (cryo-préservation)

Déposer l'échantillon sur un plot utilisé pour le cryo-MEB en enlevant le maximum de glycérol.

Plonger le plot avec l'échantillon dans l'azote liquide en agitant pendant quelques secondes pour éviter la formation de cristaux.

Lorsque la température s'est stabilisée à -80°C, transférer le plot dans l'enceinte cryostatique à l'aide d'un capuchon rempli d'azote.

Disposer le plot dans le porte-échantillon (penser à l'orientation de l'échantillon avant de le fixer)

## 5) Trimming de la surface de l'échantillon

Choisir le couteau de trimming en tournant le porte-couteau et visser le porte-couteau

Faire l'approche du couteau avec la molette N/S

Mettre l'antistatique à 100%

Sélectionner la vitesse de coupe à 80mm/s et l'épaisseur des coupes à 500nm et commencer les coupes en appuyant sur start/stop

Lorsque que la surface est lissée, reculer le couteau de trimming avec la molette N/S

Choisir le couteau cryo-histo en tournant le porte-couteau jusqu'à arriver en buter. Visser le porte-couteau

Remarques :

Penser à refroidir les outils, les cils,... avant de toucher le couteau ou l'échantillon

Nettoyer le couteau avec un cil ou une pipette en plastique par aspiration/refoulement

## 6) Coupes histo

Sélectionner les températures du couteau, de l'échantillon et de la chambre : -120°C pour tous les trois

Attendre que les températures se stabilisent

Faire l'approche du couteau avec la molette N/S

Mettre l'antistatique à 100%

Sélectionner la vitesse de coupe à 1mm/s et l'épaisseur des coupes à (500nm pour commencer puis quelques coupes à 100nm)

Choisir la fenêtre de coupe et lancer les coupes en appuyant sur start/stop.

Lorsque l'échantillon est bien lissé, reculer le couteau cryo-histo avec la molette N/S

Mettre le porte-couteau en position intermédiaire

Enlever le plot du porte-échantillon et le transférer dans le module cryo du MEB.

## 7) Arrêt de l'appareil

Eteindre et enlever l'antistatique

Appuyer sur Pump puis confirmer l'arrêt de la pompe

Enlever et passer sous l'eau du robinet le porte-échantillon et le porte couteau (avec les couteaux encore dessus). Faire un lavage final à l'eau distillée

Enlever le tuyau d'arrivée de l'azote de la chambre et du Dewar

Enlever la pompe du Dewar d'azote et refermer le Dewar avec son bouchon

Appuyer sur Heat pour nettoyer la chambre. Ne pas laisser la loupe au-dessus de la chambre et ne pas mettre le cache tant que la chambre chauffe

Nettoyer minutieusement les couteaux avec de l'alcool 50° à l'aide de bâtonnets de polystyrène

Démonter le porte-échantillon et faire sécher

Faire sécher le porte-couteau

Lorsque l'appareil est revenu à température ambiante, éteindre les deux boîtiers sous la table et la commande tactile

Mettre le cache sur la chambre cryostatique

Mettre les protections sur l'appareil et la commande tactile

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>tampon Cacodylate de Sodium</b> | Réactif A 1 |

|                                         |                                                                                         |                              |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>Cacodylate de sodium tri-hydrate</b> | $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$<br><br><b>PM : 214</b> | <b>Numéro CAS : 124-65-2</b> |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|

|              |                                        |
|--------------|----------------------------------------|
| <b>1 M</b>   | <b>214gr / 1000ml H<sub>2</sub>O</b>   |
| <b>0,2 M</b> | <b>4,28 gr / 100 ml H<sub>2</sub>O</b> |
| <b>0,1 M</b> | <b>2,14 gr / 100 ml H<sub>2</sub>O</b> |

**Ajuster le pH à 7,4**

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>tampon Sorensen</b>             | Réactif A 2 |

## TAMPON Sorensen (tampon phosphate)

### Solutions stock X $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Stock Solution X: 0.2M Monobasic Sodium Phosphate <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math></b><br><br><b>27.60 g Mono Sodium Phosphate</b><br><b>Dans 1000 ml <math>\text{H}_2\text{O}</math></b> |  Mixer longuement jusqu'à dissolution complète.<br><br> Stocker à 4°C. Peut se conserver 6 mois |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Solutions stock Y

|                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Stock Solution Y: 0.2 M Dibasic Sodium Phosphate <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></b><br><br><b>35.6 g Dibasic Sodium Phosphate</b><br><b>Dans 1000 ml <math>\text{H}_2\text{O}</math></b> |  Mixer longuement jusqu'à dissolution complète.<br><br> Stocker à 4°C. Peut se conserver 6 mois |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Solutions Finales

|                                            |                                                                                               |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Solution tampon Sorensen 0,2M PH7.4</b> | <b>Solution tampon Sorensen 0,1M PH7.4</b>                                                    |
| <b>19 ml Stock X</b><br><b>81 ml Stock</b> | <b>19 ml Stock X</b><br><b>81 ml Stock Y</b><br><b>100 ml <math>\text{H}_2\text{O}</math></b> |

**ATTENTION : lire attentivement la fiche de données de sécurité (Produit irritant):**

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>tampon Pipes</b>                | Réactif A 3 |

## TAMPON Pipes

Pour préparer une solution de PIPES à 0.1M et PH 7 il faut :

- 3g de PIPES (M=302.4)
- Dissoudre dans 75 ml d'eau distillée, la solution est trouble
- Ajuster le PH à 7 avec NaOH jusqu'à ce que la solution s'éclaircisse
- Compléter le volume à 100ml avec de l'eau distillée.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>tampon Maléate de sodium</b>    | Réactif A 4 |

## TAMPON maléate de sodium

Pour préparer une solution de maléate de sodium à 0.05M PH 6 il faut :

- 5.8g d'acide maléique  $C_4H_4O_4$  ( $M=116.07$ )
- 2g Hydroxyde de sodium NaOH
- Dissoudre dans 200ml D'eau distillée
- Ajuster le PH à 6
- Compléter le volume à 1L avec de l'eau distillée.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Résine EMBed 812 EMS</b>        | Réactif B 1 |

### EMbed 812 Resin for Microscopy

EMbed 812 is our replacement for EPON 812, the most widely used embedding resin for electron microscopy, which was discontinued in 1978. EMbed 812 provides the same excellent preservation and cutting qualities as EPON 812, and may be substituted in all similar formulations.

Luft (1961) established EPON 812 as a reliable embedding medium, excellent both for plant and animal tissue. The same advantages offered by EPON 812, are offered by EMbed 812: rapid penetration, greater contrast, easy sectioning, stability under the electron beam, satisfactory staining of most thick sections for light microscopy and thin sections for electron microscopy.

### Recommended Procedure

#### *Fixation:*

Tissues can be fixed in a wide range of fixatives. One of the more commonly used fixatives is an aldehyde (i.e.: glutaraldehyde) followed by osmium tetroxide.

#### *Dehydration:*

There are many different dehydration schedules that can be followed. A typical one is as follows:

70% Ethanol for 10 minutes  
 100% Ethanol for 10 minutes  
 100% Ethanol for 15 minutes  
 100% Propylene Oxide for 15 minutes  
 100% Propylene Oxide for 15 minutes

**\*\*NOTE:** Longer times may be required for some samples.

#### *Mixing Instructions:*

|                                     | <b>Small<br/>Amount</b> | <b>Medium<br/>Amount</b> | <b>Large<br/>Amount</b> |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Mixture A:</b>                   |                         |                          |                         |
| EMbed 812                           | 5 ml                    | 20 ml                    | 62 ml                   |
| DDSA                                | 8 ml                    | 31 ml                    | 100 ml                  |
| <b>Mixture B:</b>                   |                         |                          |                         |
| EMbed 812                           | 8 ml                    | 20 ml                    | 100ml                   |
| NMA                                 | 7 ml                    | 17 ml                    | 90 ml                   |
| <b>Final Embedding<br/>Mixture:</b> |                         |                          |                         |
| Mixture A:                          | 13 ml                   | 51 ml                    | 162 ml                  |
| Mixture B:                          | 15 ml                   | 37 ml                    | 190 ml                  |

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Résine EMBed 812 EMS</b>        | Réactif B 1 |

DMP-30\*                                      .42-.56 ml              1.3-1.7 ml              5.3-7.0 ml

\*For better penetration and stability BDMA is recommended in place of the DMP-30. The quantity of BDMA which is required is 2.5-3% while DMP-30 is 1.5-2%.

It is much simpler when mixing EMBed 812 to use a one-step single mix formula. The following formulations may be used depending on the desired hardness of the block:

|                  | <b>Soft</b>                            | <b>Medium</b>                         | <b>Hard</b>                           |
|------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>EMBed 812</b> | 20 ml                                  | 20 ml                                 | 20 ml                                 |
| <b>DDSA</b>      | 22 ml                                  | 16 ml                                 | 9 ml                                  |
| <b>NMA</b>       | 5 ml                                   | 8 ml                                  | 12 ml                                 |
| <b>DMP-30</b>    | .70-.94 ml<br>or 1.18-1.4 ml<br>(BDMA) | .66-.88 ml<br>or 1.1-1.3 ml<br>(BDMA) | .62-.82 ml<br>or 1.0-1.2 ml<br>(BDMA) |

Slight variations of the accelerator (DMP-30 or BDMA) will drastically affect the color and brittleness of the block.

Prior to measuring and mixing the resin and the anhydride should be warmed (60°C) to reduce their viscosity. Immediately before use, the two mixtures (A&B) are blended, and the accelerator added in the above mentioned proportion. Thorough mixing is imperative to be able to achieve uniform blocks.

While preparing EMBed 812, the hardness of the block can be varied to suit various sectioning conditions depending on the ratio of mixture A and mixture B in the final embedding mixture. An increase in the proportion of mixture B will make the block harder. A mixture of 1:1 has proven most successful for general use. All components of the kit should be kept at room temperature in tight stoppered bottles.

Although the mixture can be stored for up to 6 months at 4°C it is highly recommended that freshly prepared embedding medium always be used. If you choose to store the mixture you should warm it thoroughly prior to adding the accelerator.

### ***Infiltration:***

It is recommended that for all of the infiltration steps a specimen rotator be used.

1. Drain the tissue of most of the propylene oxide, leaving a little so the tissue does not dry out.
2. Replace the solvent with a 1:1 solution of propylene oxide:embedding medium and allow it to stand for at least 1 hour at room temperature.
3. A second change of 2:1 embedding medium to propylene oxide at room temperature overnight is recommended.

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Résine EMBed 812 EMS</b>        | Réactif B 1 |

4. Remove the mixture, replace it with 100% embedding medium and leave for 30 minutes-2 hours at room temperature.

#### *Embedding:*

This may be done in **EMS** embedding capsules (**EMS** Catalog #70020) or a flat embedding mold (**EMS** Catalog #70900). Transfer each sample to a dry capsule or mold and fill the mold with embedding medium. Cure the medium in an oven at 60°C for 24 hours. Blocks can be trimmed and sectioned after the blocks return to room temperature.

#### Reference

Luft, J.H.(1961), J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                             |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>résine Low Viscosity Embedding Media<br/>Spurr's Kit</b> | Réactif B 2 |

## Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit

EMS Catalog # [14300](#)

### Introduction:

Spurr's Low Viscosity embedding mixture is recommended because of its excellent penetration qualities, which provide good and rapid infiltration of tissues. It is easy to prepare, and mixes rapidly by shaking and swirling. The hardness is adjusted by changing the amount of the flexibilizer, DER 736; the blocks have good trimming and sectioning qualities and the sections are tough under the electron beam. (Grids, without supporting membranes can be used.)

### Ingredients:

[ERL 4221](#) – The direct replacement for ERL 4206.

[DER 736](#) - diglycidyl ether of polypropylene glycol, a flexibilizer to control the hardness of the polymerized block. It was selected because of its low viscosity: 30-60 cP at 25°C. It has a M.W of 380 and an epoxy equivalent of 175-205.

[NSA - nonenyl succinic anhydride](#), a hardener with a relatively low viscosity of 102.8cP at 25°C, and a M.W. of 227. A minimum exposure to air is recommended to avoid hydrolysis.

[DMAE](#) - dimethylaminoethanol (S-1) an accelerator, used because of its low viscosity and results in blocks with less color. In addition, it induces rapid cure when the temperature is elevated to 70°C. It is effective in a very low concentration. (less than 1.0%) The optimum concentration for color transparency is 0.7-0.75%.

### TECHNIQUE 1 :

Formulation: See end of Document for special formulations

|                   |          |
|-------------------|----------|
| ERL 4221          | 10 g     |
| DER 736           | 8 g      |
| NSA               | 25 g     |
| DMAE              | 0.3 g    |
| Cure Time at 70°C | 8 hours  |
| Pot Life          | 3-4 days |

|                                                                                   |                                                             |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>résine Low Viscosity Embedding Media<br/>Spurr's Kit</b> | Réactif B 2 |

### Mixing Instructions:

Add each component in turn to a disposable plastic beaker. An exact weight is recommended, and care must be used in dispensing the final amounts of each component so that no excess is added.

The catalyst (DMAE) should be added last, after gently mixing the three other components.

The complete formula should be mixed thoroughly.

The complete mixture with the hardener can be used immediately for infiltration, and then for embedding. Although the mixture can be stored in a disposable syringe, well capped and with no air, in a freezer for several months it is highly recommended that freshly prepared embedding medium always be used. If you choose to store the mixture, it is imperative that you warm it thoroughly prior to use.

### Dehydration - Infiltration and Polymerization:

This embedding media is compatible with all dehydrating agents: acetone, dioxane, ethanol, hexyleneglycol, isopropyl alcohol, propylene oxide, tert-butyl alcohol. The schedule and concentration can be established by the investigator however for a rule of thumb we recommend the following:

Dehydration is generally done at room temperature in a graded series of Ethanol starting at 50% then going to 70, 95 and 100% for no less than 20-30 minutes each step. All dehydrating agent must totally be removed during infiltration due to the fact that it will effect curing.

The embedding media is completely compatible with ethanol. Thus, it is not mandatory to have a change to propylene oxide prior to infiltration as is true for other epoxy resin mixtures. If working with plant cells it is recommended to use propylene oxide.

The infiltration (one should employ a specimen rotator) can be started by adding the embedding media to the dehydrating fluid left in the vial with the tissue(1:2) . Swirl the mixture and allow it to stand for 2- 3 hours. Then replace with a 1:1 dehydrating agent/embedding medium, swirl and allow to sit overnight.

Replace with a 1:3 dehydrating agent/embedding medium, swirl, and allow it to stand for another 2 to 3 hours. Pour and drain the mixture and add fresh embedding media (100% Spurr). For small specimens, 5-6hours; for large specimens, 5-6 hours followed by overnight. Curing takes 16-24 hours at 60°C. (The mixture can be left in an oven overnight).

[Catalog # 14300 Low Viscosity Embedding Media Kit](#) consist of:

- Catalog [#15004 ERL 4221](#) - [vinyl cyclohexene dioxide](#) - 225ml
- Catalog [#13000 DER 736](#) - [diglycidyl ether polypropylene glycol](#)- 225ml
- Catalog [#19050 NSA](#) - [nonenyl succinic anhydride](#)-450ml
- Catalog [#13300 DMAE](#) - [dimethylamino ethanol](#)- 25ml

|                                                                                   |                                                             |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>résine Low Viscosity Embedding Media<br/>Spurr's Kit</b> | Réactif B 2 |

### **Special Formulations:**

For Biopsies from Kidney, Liver, GI, Esophagus

Mixing Directions :

ERL 4221 18ml DER 736 14ml NSA 48 ml DMAE 0.6ml

### **Dehydration:**

50%, 70%, 95% ETOH for 20-30 minutes each change  
2 x 100% ETOH for 30 minutes

### **Infiltration\*:**

1 part Spurr to 2 parts ETOH for 3 hours  
1 TO 1 overnight/over weekend  
3 to 1 (Spurr to ETOH) 3 hours  
100% Spurr 6-8 hours

### **Polymerization:**

Then Polymerize overnight (12 hour Max) at 70-80 Degrees C  
\*All infiltration Procedures shall be run on a Rotator.

For Biopsies from Muscle, Nerve or Skin

### **Dehydration:**

50%, 70%, 95% ETOH for 20-30 minutes each change  
2 x 100% ETOH for 30 minutes

### **Infiltration\*: (Spurr/ETOH 100%)**

1 part Spurr to 2 parts ETOH 24 hours (over weekend)  
1 TO 1 24 hours (over weekend)  
3 to 1 (Spurr to ETOH) 24 Hours  
100% Spurr 24 Hours

### **Polymerization:**

Then Polymerize overnight (12 hour Max) at 70-80 Degrees C  
\*All infiltration Procedures shall be run on a Rotator.

### **References:**

|                                                                                   |                                                             |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique                          | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>résine Low Viscosity Embedding Media<br/>Spurr's Kit</b> | Réactif B 2 |

Spurr, A.R.(1969), J. Ultrastruct. Res. 26,31.

## TECHNIQUE 2 :

A- Déshydratation à l'acétone (ou à l'alcool), 25, 50, 75, 90, 100, 100,100%  
10 minutes à température ambiante à chaque étape.

B- Inclusion dans le Spurr :

- 1- Préparation du Spurr : 13 g NSA  
(sous la hotte)      5 g ERL  
3 g DER  
avec 0.2 g S-1 (produit accélérateur), on obtient S2  
avec 0.1 g S-1 on obtient S1

Mettre tous les produits, mélanger 20 minutes.

Aliquoter en seringues identifiées S1 et S2

- 2- Inclusion : bouchons fermés

Substituer progressivement dans des bains Spurr et acétone :

25, 50, 75% pendant 30 minutes chacun, avec S1

100% 30 minutes avec S2 puis une heure avec 100% de S2

- 3- Polymérisation :

Mettre les échantillons dans l'étuve à +60°C durant 24H.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Film formvar</b>                | Réactif C 1 |

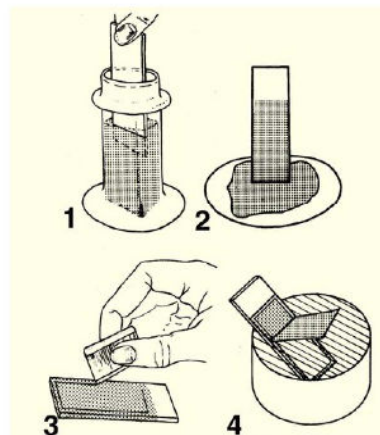
### Fabrication d'un Support-film de Formvar

1- Plonger une lame parfaitement propre et dégraissée dans Un petit b cher , Borel ou Coplin-Jar rempli de Formvar 0,5% dans du chloroforme (filtré au préalable et à l'abri de l'humidité)

2- Retirer au bout d'une minute la lame , à la verticale avec une vitesse régulière ; égoutter et sécher (5 à 10 mn)   la verticale sur un papier filtre.

3- Découper à l'aide d'une lame neuve

4- Déposer le film de formvar sur une surface d'eau ultra-pure en inclinant la lame pour faciliter de détachement du film



### Caractéristiques physiques des Films-Support

| Résistance mécanique | Transparence au faisceau d'e- | Stabilité sous le faisceau d'e- |
|----------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Collodion- carbone   | Collodion                     | Collodion-Carbone               |
| Formvar              | carbone                       | Carbone                         |
| Collodion            | Formvar                       | Formvar                         |
| Carbone              | Collodion-Carbone             | Collodion                       |

1

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Film carbone</b>                | Réactif C 2 |

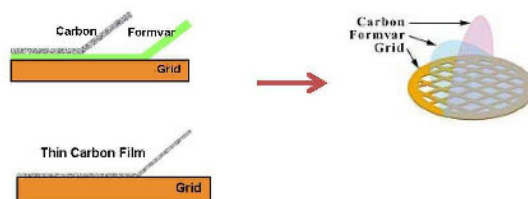
## Film de carbone

Le carbone est un élément léger qui n'empêche nullement la transmission des électrons.  
On dépose parfois un film de carbone sur le support –film type Formvar ou collodion pour constituer

-un support **Formvar –carbone** ou

-collodion-carbone ou bien

-un film seulement de carbone



### Propriétés physiques du carbone

Le carbone est transparent aux électrons et permet de diffuser l'énergie accumulée au point d'impact sur l'échantillon sur toute la surface de la grille (stabilise l'échantillon sous le faisceau d'électrons).

### Préparation du Film

Évaporer 10 nm de carbone à l'évaporateur sur une lame de Mica fraîchement clivée .

Étaler le film de carbone sur une surface d'eau (propre de poussières) à l'aide d'un accessoire construit au labo.

Faire baisser doucement le niveau d'eau , pour déposer le film de carbone sur les grilles posées sur un filtre

Sécher , puis stockées dans une boîte à grilles à l'abri de l'humidité.

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------|
|  | Protocole Microscopie Électronique | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Film collodion</b>              | Réactif C 3 |



N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée

|                                                                                   |                                                    |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------|
|  | <b>Protocole Microscopie Électronique</b>          | Indice 01   |
|                                                                                   | <b>Préparation citrate de plomb selon Reynolds</b> | Réactif D 1 |

### Préparation du Citrate de plomb selon Reynold

Peser **1.33g nitrate de plomb** + **1.76g citrate de sodium**.

Ajouter **30ml eau distillée**.

- agiter énergiquement durant 1 minute.
- laisser se dissoudre 30 minutes
- Ajouter **8ml NaOH 1M** and mixer.
- Diluer dans **50ml d'eau distillée**.
- pH Final doit être pH12 et aspect translucide.

(Durée de vie. 6 mois, dans une pissette)

**N'est plus utilisable s'il devient trouble**

### Préparation de l'acétate d'uranyle :

**1% l'acétate d'uranyle dans 50% méthanol ou éthanol**

**1% l'acétate d'uranyle dans l'eau distillée**

### Contraste des coupes fines

| <b>Contraste 1</b>                | <i>Résine époxy</i> | <i>Résine Acrylique</i> |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Acétate uranyle <i>aqueux</i>     | 20 mn               | Non conseillé           |
| Acétate uranyle <i>alcoolique</i> | 10 mn               | 5 mn                    |

Laver avec précaution dans trois bécjers d'eau distillée (fraîche)

**Contraste 2 :** au citrate de plomb (attention réagit avec le CO<sub>2</sub>)

Dans une boîte de pétri recouverte (en atmosphère NaOH avec des Pastilles de NaOH)

**1 à 5 mn** quelque soit le type de résine

Laver avec précaution dans trois bécjers d'eau distillée (fraîche)

### Laisser sécher à l'abri de la poussière

N.B : Une variation de +/- 10% des mesures est tolérée