



Protocoles

Microscopie électronique

Indice 02

OBJET ET DOMAINES 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: **S.Balor**

Validé par: **B.Payré**

SOMMAIRE

Protocoles de Microscopie Electronique à Transmission

MET Température ambiante

A-	<u>Protocoles étude morphologique</u>	Indice	Nb de pages
	1 Fixation classique cellules en culture EMbed812/cacodylate	01	2
	2 Fixation classique cellules en culture EMbed812/cacodylate Version 2 (MET B ex-ref CMEAB)	01	1
	3 Fixation classique cellules en culture EMbed812/sorensen (MET C ex-ref CMEAB)	01	2
	4 Fixation morpho Peau Humaine	01	2
	5 fixation Peau Conservation des lipides	01	2
	6 Fixation Morphologique Botanique racines et Nodules	01	1
	7 Fixation Morphologique Cerveaux d'abeille	01	2
	8 Fixation de cellules sur lamelle de verre	01	2
	9 Fixation Morphologique des bactéries	01	2
	10 Fixation des tissus - tampon sorensen (MET A ex-ref CMEAB)	01	2
	11 Fixation des tissus - tampon cacodylate (MET D ex-ref CMEAB)	01	2
B-	<u>Protocoles immunodétection</u>	Indice	Nb de pages
	Fixation		
	1 Fixation de cellules en culture pour immunomarquage (MET E ex-ref CMEAB)	01	1
	2 Fixation Levures pour immunomarquage	01	1
	3 Fixation générale pour cryocoupes et immunomarquage	01	2
	4 Fixation pour cryocoupes et immunomarquage de levures	01	2
	Immuno Marquage Post Embedding		
	5 Immunomarquage(MET) Post-inclusion version 1	01	1
	6 Immunomarquage(MET) Post-inclusion version 2	01	1
	7 Immunomarquage(MET) Post-inclusion version 3	01	1
	Immuno Marquage Pre Embedding		
	8 Immunomarquage PreEmbedding selon BBI	01	1
	9 Immunomarquage Nanogold Pre-Embedding	01	4

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

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

REACTIFS

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

	<p style="text-align: center;">Protocole Microscopie Électronique Fixation classique de cellules en culture Embed812/cacodylate</p>	<p style="text-align: center;">Indice 01 MET A 1</p>
---	---	--

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 sucre 0,1 M, CaCl₂ 5 mM et MgCl₂ 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 sucre 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 tétr oxyde d'osmium

- Remplacer le tampon par du tétr oxyde d'osmium 1% en tampon Cacodylate 0.1 M, pH7,2 CaCl₂ 5 mM et MgCl₂ 5mM.
- Laisser les cellules en présence de fixateur pendant 1 heure à température ambiante.
- Laver deux ou trois fois avec du tampon Cacodylate sans sucre.

c) Mise en agar 2% en tampon Cacodylate 0.1 M, pH7,2 CaCl₂ 5 mM et MgCl₂ 5mM.

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

d) Fixation à l'acétate d'uranylique

- 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'uranylique 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 MET A 1
	Fixation classique de cellules en culture Embed812/cacodylate	

- 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 MET A 2
	Fixation classique de cellules en culture Embed812/cacodylate version 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 surnagent, remettre de l'Epon et centrifuger.

7° Mettre le culot avec son surnagent 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 MET A 3
	Fixation classique de cellules en culture Embed812/sorensen	

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	150 mOsM
1 volume de Sorensen pH=7.4, 0.2 M	200 mOsM
2 volumes d'Osmium 2%	40 mOsM
<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
	Fixation classique de cellules en culture Embed812/sorensen	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 MET A 4
	Protocole de fixation morphologique peau humaine	

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 minimun.

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	400 mOsM
RuO ₄ 0.5 %	0.25 %	?
<i>Osmolarité totale</i>		<i>> 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 MET A 4
	Protocole de fixation morphologique peau humaine	

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 MET A 5
	Fixation peau humaine – conservation des lipides	

fixation

Morphologie

2% Glutaraldehyde dans tampon cacodylate de sodium 0,1M durant 4h à 4°C

ou

immunomarquage

4% Paraformaldehyde + 0,05% Glutaraldehyde dans cacodylate de Na 0,M pH 7,4 durant 4 h à 4°C

2 Lavage

Cacodylate de Sodium 0,2 M pH 7,4 (4 lavages)

2 lavages de 5 et 15 mn
1 lavage nuit
1 Lavage 5 mn

Redécouper l'échantillon en plus petit



3 Post Fixation

(manipuler à l'obscurité)



Conservation des structures lipidiques

Tetroxide de Ruthénium RuO₄ 0,25% dans cacodylate de Na 0,2M pH 7,4 3 fois 20 mn (renouveler le fixateur en agitant) à 4°C .

4 Lavage

Cacodylate de Sodium 0,2 M pH 7,4

2 fois 10 mn

5 déshydratation

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
	Fixation peau humaine – conservation des lipides	MET A 5

Imprégnation

EmBed 812, 12 h à T^* ambiante.

Inclusion (polymérisation)

EmBed 812-Araldite 502, étuve à $60^{\circ}C$ 48h.

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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET A 6
	Fixation Morphologique Botanique Racines et Nodules	

1. Fix in 3% GTA/1%PF in 0.2M NaCac buffer with 2.5 mM CaCl2 pH7.2:

Cut 1-3mm³ root nodule discs and place in fresh fix; apply gentle vacuum until specimens sink; then complete fine trimming of samples(@1mm³), if necessary. Place in fresh fix and leave under vacuum overnight.

Fix prep: 2ml 70% GTA + 11ml. 0.4 M Cacodylate with 5 mM CaCl2, pH7.2; 22ml. 0.2 M Cacodylate with 2.5 mM CaCl2, pH7.2 and 11ml 4%PF in dH₂O with 5mM CaCl2. DAY 1

2. Rinse in 0.3M NaCac buffer with 2.5mM CaCl2, pH7.2. several washes over one hour, with light vacuum

3. Post-fix in 2% OsO₄ in 0.25M NaCac buffer with 2.5mM CaCl2, pH7.2, for 3 hours at RT.

Fix Prep: 1 vol. 4% OsO₄ in dH₂O. + 1 vol. 0.4 M Cacodylate with 5 mM CaCl2, pH7.2 + 2 vol. 0.3

M Cacodylate with 2.5 mM CaCl2, pH7.2.

4. Rinse in dH₂O. 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 CaCl2 pH 7.2

0.3 M Na Cacodylate + 2.5mM CaCl2 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 MET A 7
	Fixation Morphologique des cerveaux d'abeille	

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:

<i>Paraformaldéhyde</i>	1%
<i>Glutaraléhyde</i>	2.5%
<i>Tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2</i>	

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 mili-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 (OsO₄, 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 MET A 7
	Fixation Morphologique des cerveaux d'abeille	

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'épon 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'exterieur du moule. Mettre à polymériser au moins 48 h à 60°C.

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

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

	Protocole Microscopie Électronique Fixation de cellules sur lamelles Spurr/cacodylate	Indice 01 MET A 8
---	--	----------------------

Composition mélange Sp1 et Sp2 de résine SPURR

Sp1	NSA : 39g	Sp2	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 Fixation Morphologique de Bactéries	Indice 01 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 Fixation Morphologique de Bactéries	Indice 01 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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET A 10
	Préparation de tissus dans le tampon de Sorensen	

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 côté

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

	Protocole Microscopie Électronique Préparation de tissus dans le tampon de Sorensen	Indice 01 MET A 10
---	--	-----------------------

6°) Substitution

1 volume EmBed 812
 1 volume d'oxyde de propylène
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, 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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET A 11
	Préparation de tissus dans le tampon cacodylate	

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 ₂ 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 côté

4°) Post fixation

Produits	Concentration finale	Osmolarité
1 volume de Cacodylate pH=7.4, 0.4 M	0.2 M	400 mOsM
1 volume d'Osmium 2%	1 %	40 mOsM
<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

	Protocole Microscopie Électronique Préparation de tissus dans le tampon cacodylate	Indice 01 MET A 11
---	---	-----------------------

6°) Substitution

1 volume EmBed 812
 1 volume d'oxyde de propylène
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, 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

	Protocole Microscopie Électronique Fixation de cellules en culture pour Immuno-marquage	Indice 01 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

	Protocole Microscopie Électronique Fixation de levures pour Immunomarquage	Indice 01 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 **NH₄Cl** (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

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: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O} = 27.6 \text{ g}$ 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 cm² flask is enough.

	Protocole Microscopie Électronique Fixation générale pour cryocoupes et immunomarquage	Indice 01 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

	Protocole Microscopie Électronique Fixation pour cryocoupes et immunomarquage de levures	Indice 01 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 mm³.
- 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)

	Protocole Microscopie Électronique Fixation pour cryocoupes et immunomarquage de levures	Indice 01 MET B 4
---	---	----------------------

0.08 g of MgCl₂.6H₂O (final concentration: 4 mM)

0.76 g of EGTA (final concentration: 20 mM)

- First solubilize 3 pellets of NaOH in 75 ml of H₂O.

- 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 MgCl₂ 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

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage en post-inclusion Version 1	Indice 01 MET B 5
---	--	----------------------

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 PO₄HNa₂ 12H₂O ; 0,01M PO₄H₂K , pH 7,2 à 7,4).

Tampon PBS (pH=7,2) pour 1000ml H2O

- 7,65 g de NaCl + 0,724 g de Na₂PO₄ + 0,210 g de NaPO₄

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

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage en post-inclusion Version 2	Indice 01 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

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

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

à T° ambiante

NGS : Normal Goat Serum

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

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage Pre Embedding selon BBI	Indice 01 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

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage Nanogold Pre-Embedding	Indice 01 MET B 9
---	---	----------------------

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

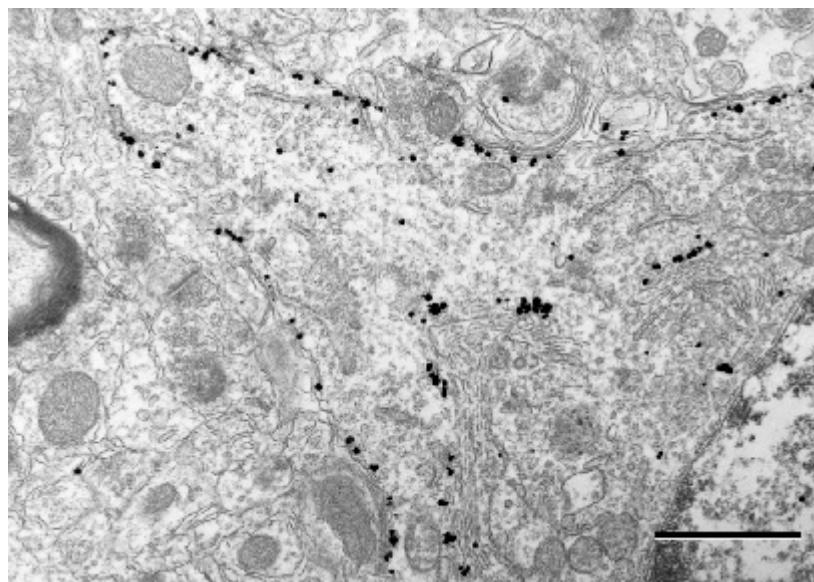
Contents

- [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.

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage Nanogold Pre-Embedding	Indice 01 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% NaN3 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% OsO₄ in 0,1 M phosphate buffer for 30 minutes.
15. Wash, stain with uranyl acetate, dehydrate in ethanol, and embed.

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage Nanogold Pre-Embedding	Indice 01 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).
 - o [Abstract](#) (from [JHC Online](#)).
2. Du, J.; Tao-Cheng, J.-H.; Zerfas, P., and McBain, C. J. The K⁺ 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).
 - o [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:

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET B 9
Immunomarquage Nanogold Pre-Embedding		

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

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage Sur cryocoupes	Indice 01 MET B 10
---	---	-----------------------

METHODE DE TOKUYASU

- Rincer 3 x en PBS 1X après fixation
- Incuber 15 min en PBS + NH4Cl 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 sucre. 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)

	Protocole Microscopie Électronique Immunomarquage Sur cryocoupes	Indice 01 MET B 10
---	---	-----------------------

IMMUNOMARQUAGE SUR CRYOCOUPE

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

Blocage des aldéhydes :

5 x 2 min en PBS + NH4CL 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^{er} 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 H2O

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

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-Hydroxyethylpipерazine-N'-2-ethanesulphonic) ou dans 1% d'acetate ammonium.
- Le tampon P.B.S. est déconseillé car des résidus de sel contamine la grille à l'observation et après lavage le contrast 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.

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

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

1. Mettre une goutte 1% acetate ammonium 1% sur une lame de verre propre.
2. Déposer une goutte d'échantillon de bactérie 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 sucre dans l'eau. Mélanger dans les proportions respectives (5–1) échantillon–colorant et continuer selon la méthode A au 3^{em} 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 contraste moindre. Il est utilisé surtout pour mettre en évidence de petites particules.

TUNGSTATE METHYL-AMINE

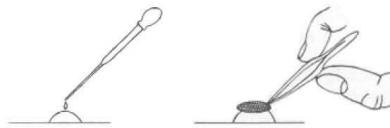
Utiliser dans les mêmes cas que phosphotungstate de potassium, mais à 2% dans l'eau distillée à pH 6,5 final.

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

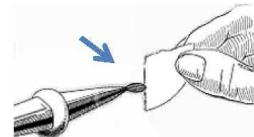
Coloration négative

Préparation Contrastant

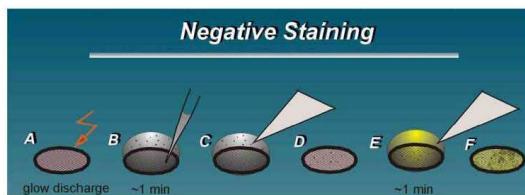
Bien dissoudre 1gr d'acétate d'uranyle dans l'eau.
 Filtrer avec un filtre seringue de 0,2 μ
 Stocker à l'abri de la lumière



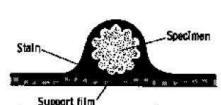
→ Mettre au contact votre grille face Carbonée et ionisée sur une goutte de votre échantillon (1mn)



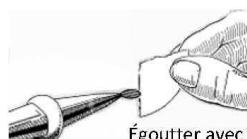
Égoutter avec un papier filtre



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

	Protocole Microscopie Électronique Coloration des coupes semi-fines en ME	Indice 01 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

	Protocole Microscopie Électronique Protocole contraste des coupes Ultrafines	Indice 01 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 boite 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 boite 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

Fixateur

Fixateur Antony : glutaraldéhyde dans l'acétone [0,1%] finale
OsO₄ dans l'acétone [0,01%] finale
acétate d'urane dans le méthanol [0,1%] finale

Du fixateur est mis à refroidir dans le cryosubstitueur

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.

	Protocole Microscopie Électronique Cryofixation et Cryosubstitution levures	Indice 01 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°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°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.

	Protocole Microscopie Électronique Cryofixation et Cryosubstitution levures	Indice 01 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°C le lendemain matin (5°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°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 µl 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 sur H)

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET E 1
	Cryofixation et Cryosubstitution levures	

Imprégnation

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

1^{er} bain HM20/EtOH [1/1] préalablement refroidi pendant 1 h

2^{ième} bain HM20/EtOH [2/1] préalablement refroidi pendant 2h

3^{ième} 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 réine 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**.

Abaïsser 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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01
	Cryosubstitution	

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 sucre 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 sucre.

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:

Methanol: K4M 1/1 -40°C 2h

Methanol : K4M 2/1 -40°C 2h

K4M pure -40°C 2h

K4M pure -40°C toute la nuit

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET F 1
	Cryosubstitution	

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.*

	Protocole Microscopie Électronique Cryosubstitution	Indice 01 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

	Protocole Microscopie Électronique Inclusion à basse température (PLT progressive low température)	Indice 01 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% (NH4OH) (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

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

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	

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

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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MET G 1
	Cryo-stockage des échantillons pour cryocoupes	

1) Fixation

a) Première fixation

Produits	Concentration finale
Paraformaldéhyde 16%	4%
Glutaraldéhyde 25%	0.1%
Tampon Sorensen 0.2M	0.1M
H ₂ 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 ₂ 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 1mm³.

3) Blocage des aldéhydes libres

Produits	Concentration finale
Glycine	50mM
Tampon Sorensen 0.2M	0.1M
H ₂ O distillée	qsp

Durée : 5 min, à température ambiante

4) Cryoprotection

Produits	Concentration finale
Sucrose	2.3M
Tampon Sorensen 0.2M	0.1M
H ₂ O distillée	qsp

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

5) Congélation de l'échantillon



Protocole Microscopie Électronique

Cryo-stockage des échantillons pour cryocoupes

Indice 01

MET G 1

Monter l'échantillon sur un clou en enlevant le maximum de sucre (pour la peau : laisser du sucre 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.

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)

Abaïsser 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

Selectionner 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%

Selectionner 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

	Protocole Microscopie Électronique Cryoultramicrotome	Indice 01 MET G 2
---	--	----------------------

côté. Si vous taillez les côtés avec une épaisseur totale de 100 µm, prévoir une marge d'environ 120 µm.

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

Selectionner 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%

Selectionner 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

Selectionner 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 dégelée, la placer sur une grille Ni carbonée

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

6) Arrêt de l'appareil



Protocole Microscopie Électronique

Cryoultramicrotome

Indice 01

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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MEB A 1
	Préparation de tissus dans le tampon SORENSEN	

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°) Dessication

Point critique

5°) Métallisation

1.2 volt, 10 mA, durée 3 à 4 mn (100 Å.mn⁻¹)

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 MEB A 2
	Préparation de tissus dans le tampon cacodylate	

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	H ₂ O 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 Å.mn⁻¹)

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 Å.mn⁻¹)

1°) Fixation

Glutaraldéhyde

Durée : 1h minimun à 4°C

2°) Lavage

Tampon cacodylate

Durée : 12 h à 4°C, 2 bains minimun.

3°) Post fixation

Osmium OsO4

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°) Déssication**9°) Métallisation**

	Protocole Microscopie Electronique	Indice 01 MEB B1
	Cryoplanning	

1) Fixation

Produits	Concentration finale
Glutaraldéhyde à 4%	2 %
Sörensen, pH = 7.4, 0.2 M	0.1 M
Osmolarité totale	

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)

Abaïsser 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

Selectionner 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 (coupeaux 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

	<p style="text-align: center;">Protocole Microscopie Électronique tampon Cacodylate de Sodium</p>	<p style="text-align: center;">Indice 01 Réactif A 1</p>
---	--	--

Cacodylate de sodium tri-hydrate	Na(CH₃)₂ AsO₂ • 3H₂O	Numéro CAS : 124-65-2
	PM : 214	

1 M	214gr / 1000ml H₂O
0,2 M	4,28 gr / 100 ml H₂O
0,1 M	2,14 gr / 100 ml H₂O

Ajuster le pH à 7,4

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

TAMPON Sorensen (tampon phosphate)

Solutions stock X NaH₂PO₄.1H₂O

Stock Solution X: 0.2M Monobasic Sodium Phosphate NaH₂PO₄-H₂O

**27.60 g Mono Sodium Phosphate
Dans 1000 ml H₂O**

➊ Mixer longuement jusqu'à dissolution complète.

➋ Stocker à 4°C. Peut se conserver 6 mois

Solutions stock Y

Stock Solution Y: 0.2 M Dibasic Sodium Phosphate Na₂HPO₄.2H₂O

**35.6 g Dibasic Sodium Phosphate
Dans 1000 ml H₂O**

➊ Mixer longuement jusqu'à dissolution complète.

➋ Stocker à 4°C. Peut se conserver 6 mois

Solutions Finales

Solution tampon Sorensen 0,2M PH7.4	Solution tampon Sorensen 0,1M PH7.4
19 ml Stock X 81 ml Stock	19 ml Stock X 81 ml Stock Y 100 ml H₂O

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
	tampon Pipes	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
	tampon Maléate de sodium	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 C4H4O4 (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 Résine EMBed 812 EMS	Indice 01 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:

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

	Protocole Microscopie Électronique	Indice 01 Réactif B 1
	Résine EMBed 812 EMS	

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:

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

	<p style="text-align: center;">Protocole Microscopie Électronique Résine EMBed 812 EMS</p>	<p style="text-align: center;">Indice 01 Réactif B 1</p>
---	---	--

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 résine Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit	Indice 01 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 résine Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit	Indice 01 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, hexylene glycol, 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 résine Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit	Indice 01 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 résine Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit	Indice 01 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

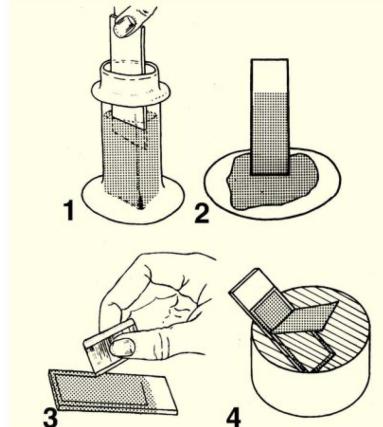
Fabrication d'un Support-film de Formvar

1- Plonger une lame parfaitement propre et dégraissée dans Un petit bêcher , 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) à 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

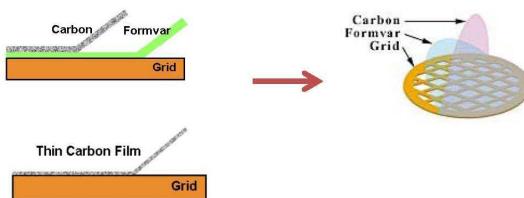
1

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

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'impacte 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.

1

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



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

	Protocole Microscopie Électronique Préparation citrate de plumb selon Reynolds	Indice 01 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

Contraste 1	Résine époxy	Résine Acrylique
Acétate uranyle aqueux	20 mn	Non conseillé
Acétate uranyle alcoolique	10 mn	5 mn

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

Contraste 2 : au citrate de plomb (attention réagit avec le CO2)

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 béchers d'eau distillée (fraîche)

Laisser sécher à l'abri de la poussière

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