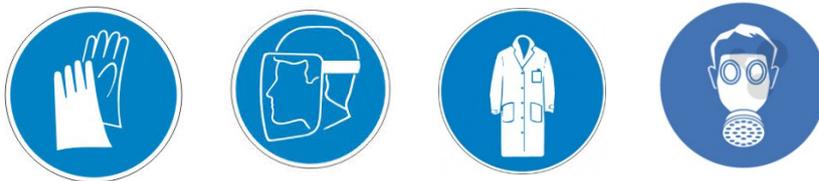


 UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE	FICHE TECHNIQUE Fixation pour ME	MO 1	Version 1
	CMAbio3	13 octobre 2023	Page 1 sur 3

Pictogrammes de sécurité :



Précautions particulières :



Ce mode opératoire utilise des produits toxiques :

Eviter le contact avec la peau et leurs vapeurs

Le travail sera effectué avec une blouse des gants sous une sorbonne, ne pas souiller les outils de travail avec des gants sales, changer de gant autant de fois que nécessaire
! chaque déchet est éliminé dans une récipient dédié ! surtout pas à l'évier.

Le manipulateur devra avoir pris connaissance des fiches de sécurité des produits, portera une blouse et des gants, travaillera sous la hotte derrière la vitre.

Les fixateurs, solutions de cacodylate et résine sont des produits toxiques :

Eviter le contact avec la peau et leurs vapeurs

Eviter le contact avec la peau et leurs vapeurs le travail sera effectué avec une blouse des gants sous une sorbonne, ne pas souiller les outils de travail avec des gants sales, changer de gant autant de fois que nécessaire

! chaque déchet est éliminé dans une bouteille dédiée sous la hotte

L'osmolarité du sang de mammifères : 300 mOsm ; l'eau de mer : 1100 mOsm attention f(pH,t°)

Un bon résultat est obtenu avec un milieu légèrement hypertonique

Osmolarité

La pression osmotique et le pH des solutions employées au cours de la fixation doivent correspondre à la pression osmotiques des animaux fixés.

L'osmolarité du plasma des mammifères est de 300 mOsM (pH 7.4), celle du milieu intérieur des invertébrés marins est voisine de celle de l'eau de mer est de 1100 mOsM (pH 7.8)

Rédaction	Validation	Approbation
Nom(s): GOUX Didier 16 01 2017	Nom(s):	Nom(s):

 UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE	FICHE TECHNIQUE		
	Fixation pour ME	MO 1	Version 1
CMABio3		13 octobre 2023	Page 2 sur 3

L'osmolarité d'une solution molaire d'un corps non ionisable est de 1000 mOsM. L'osmolarité d'une solution molaire d'un corps ionisable est de 1000 mOsMx le nombre de particules dissociées. Ensuite les osmolarités des corps en solutions s'ajoutent

Une solution à 2% d'un corp non ionisable, (concentration : 20g/l). Substance de poids moléculaire PM

Osmolarité=1000*(1/PM)*(concentration en g/l)

Si osmium PM 250, 1.5% soit 15g/l ; 1000* (1/250)x15=60 mOsM. Si dissociable en deux molécules, Si NaCl 58.5g/l, 1000* ((1/58.5)*58.5)*2 = 2000 mOsM

Solution tampon phosphate sorensen (selon la littérature il ne faut pas l'utiliser en présence d'eau de mer, les phosphate précipitent, mais c'est un artefact que je n'ai pas constaté)

Le manipulateur portera une blouse et des gants, travaillera sous la hotte derrière la vitre.

Pendant la fixation les échantillons devront être bien enfermés hermétiquement pour que les vapeurs de fixateur soient bien contenues

! chaque déchet est éliminé dans une bouteille dédiée sous la hotte, le gluta a sa poubelle spécifique

Échantillon :

Un échantillon massif devra être le plus petit possible, idéalement ils devra mesurer 1mm³ ou avoir au moins une dimension de l'ordre de 1mm.

Les échantillons devront être fixés par un volume d'au moins 50x le leur, typiquement au moins 500µl. Attention si le tube n'est pas plein, l'échantillon peut se coller à sec et ne plus être dans le fixateur.

Il est préférable d'utiliser plus de 1% de glutaraldéhyde qualité Microscopie électronique (typiquement 2.5%) sauf si la fixation se prolonge.

Dans le cas de suspension de cellules il faudra veiller à ce que le nombre de cellules soit suffisant pour palier aux pertes inhérentes à la manipe.

Un culot de cellules de 30 µl final (rincé) est suffisant (ce qui donne est fond d'épendorf (1.5ml) de 3 mm de haut ?), il faut donc fixer 40 à 50µl de culot cellulaire (ce qui donne un fond d'épendorf (1.5ml) de 5-6mm de haut) 100µl sont idéaux

Les échantillons doivent être rincés pour enlever le milieu de culture (eau phy, pbs)
Sans être mis au sec >enlever le surnageant par pipetage

La centrifugation doit être d'au moins 400G voir 1000G pour bien les rassembler,
400G cellules eucaryotes, 1000G bactéries.

Rédaction	Validation	Approbation
Nom(s): GOUX Didier 16 01 2017	Nom(s):	Nom(s):

 UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE	FICHE TECHNIQUE		
	Fixation pour ME	MO 1	Version 1
CMAbio3		13 octobre 2023	Page 3 sur 3

Seules les bactéries peuvent l'être à 5000g sans être abîmées. Et ce 10mn,

Les culot seront resuspendus par un grand volume de fixateur (800 µl est un grand volume pour un culot qui ne dépasse pas les 100µl)

Si un tapis cellulaire est fixé pour une coupe transversale (plan de coupe perpendiculaire), il faut fournir le tapis cellulaire le plus dense possible, sinon vous prenez le risque de voir très peu de cellules au MET.

Fixation :

Le glutaraldéhyde est un produit qui ne se conserve pas indéfiniment, le tampon de fixation le plus utilisé est le cacodylate de sodium (dangereux car contient des traces d'arsenic)

Le CMAbio3 peut vous fournir ce fixateur/tampon

Protocole classique (osmolarité de

-Fixation Glutaraldéhyde : 2.5% en tampon cacodylate 0.1M pH 7.2 (nuit ou plus à 4°C)

Conditionnement

Si des échantillons massifs sont fixés, transportés dans des tubes, les tubes à centrifuger de 2ml à fond rond permettent un préparation facilitée (le CMAbio3 peut vous fournir ces tubes) Dans le cas de suspensions cellulaires, des tubes à centrifuger classiques seront préférables. Si les échantillons sont très grands, nombreux ils pourront être transportés dans des tubes résistants plus grands.

Si vous apportez des lamelles de cultures, nous vous conseillons (et pouvons fournir) des lamelles en verre rondes (ou des lamelles de thermanox 13mm de diamètre), la fixation et le traitemnt pourra alors se faire en boite de 24 puits (attention aux cinétiques/fixation)

Bien sceller la boite au parafilm,

Le transport et stockage des échantillons devra se faire dans des conditions de sécurité optimisées. Par exemple dans un porte tube dédié (ou boite de puits), enfermé dans un sachet zip (de type congélation), et dans une boite hermétique à 4°C/sur glace ou avec un refroidissement assuré par des blocs froids.

Rédaction	Validation	Approbation
Nom(s): GOUX Didier 16 01 2017	Nom(s):	Nom(s):