



HAL
open science

Préparation en routine par micro-ondes pour l'observation ultrastructurale

A Geeverding, L Berry, J.-P Baudoin, C Gillet, C Cazevielle, M Trichet, C
Boulogne, C Péchoux, A Canette

► **To cite this version:**

A Geeverding, L Berry, J.-P Baudoin, C Gillet, C Cazevielle, et al.. Préparation en routine par micro-ondes pour l'observation ultrastructurale. LES TECHNIQUES DE PREPARATION D'ECHANTILLON “ Préparation chimique, Cryo-préparation, Artéfacts ”, May 2023, Porquerolles, France. . hal-04692298

HAL Id: hal-04692298

<https://hal.science/hal-04692298v1>

Submitted on 9 Sep 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Public Domain

Préparation en routine par micro-ondes pour l'observation ultrastructurale

A. Geeverding¹, L. Berry², J.-P. Baudoin³, C. Gillet⁴, C. Cazevielle⁵, M. Trichet¹, C. Boulogne⁴, C. Péchoux⁶ and A. Canette¹

¹Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Service de Microscopie Électronique (IBPS-SME), Paris, France.

²LPHI, University of Montpellier, CNRS, UMR5235, Montpellier, France.

³Aix-Marseille Univ, MEPHI, APHM, IRD, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France.

⁴Imagerie-Gif, Electron Microscopy Facility, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France.

⁵Institut de Neurosciences de Montpellier (INM), Université de Montpellier-INSERM, 34091 Montpellier, France.

⁶Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, MIMA2 Imaging Core Facility, 78350 Jouy-en-Josas, France.



Quelques références

| | |
|--|--|
| 1985 : Login GR, Dvorak AM. Microwave energy fixation for electron microscopy. Am J Pathol. | 1 ^{ère} fixation par µondes |
| 1994 : Marani E, Horobin RW. Overview of Microwave Applications in the Neurosciences. J Neurosci Methods. | Revue sur les paramètres clés |
| 1997 : Giberson RT, Demaree RS Jr, Nordhausen RW. Four-hour processing of clinical/diagnostic specimens for electron microscopy using microwave technique. J Vet Diagn Invest. | 1 ^{ère} préparation complète par µondes |
| 2003 : Giberson RT, Austin RL, Charlesworth J, Adamson G, Herrera GA. Microwave and digital imaging technology reduce turnaround times for diagnostic electron microscopy. Ultrastruct Pathol. | Revue sur un appareil commercial |
| 2012 : Carpentier A, Abreu S, Trichet M, Satiat-Jeunemaitre B. Microwaves and tea: new tools to process plant tissue for transmission electron microscopy. J Microsc. | Application des µondes sur plantes |
| 2013 : Aioun J, Chat S, Bordat C, Péchoux C. Antigen recovery and preservation using the microwave irradiation of biological samples for transmission electron microscopy analysis. Micron. | Application des µondes pour l'immunocytochimie |
| 2014 : Webster P. Microwave-assisted processing and embedding for transmission electron microscopy. Methods Mol Biol. | Protocole µondes pour l'ultrastructure |
| 2021 : Le Bideau M, Wurtz N, Baudoin JP, La Scola B. Innovative Approach to Fast Electron Microscopy Using the Example of a Culture of Virus-Infected Cells: An Application to SARS-CoV-2. Microorganisms. | Application des µondes sur cellules adhérentes |

En favorisant l'agitation moléculaire, la réactivité chimique et la diffusion des solutions, les micro-ondes ont un intérêt à chaque étape :



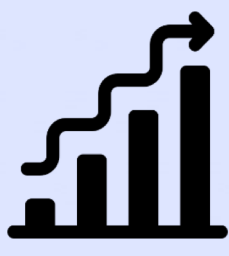
Fixation, contraste et polymérisation plus rapides



Meilleure imprégnation (tissus denses, imperméables ou spongieux)

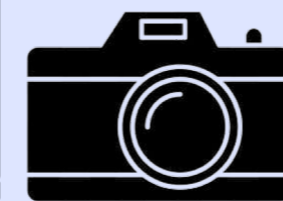


Appareils commerciaux dédiés = **reproductibilité, flexibilité, simplicité et ergonomie**



Améliorations optionnelles (chambre sous vide, agitation, refroidissement local et automatisation)

A travers l'utilisation en routine de 3 appareils commerciaux, nous illustrons ici les résultats obtenus sur une variété d'échantillons.



Pelco Biowave

+ :
compartiment sous vide, refroidissement local



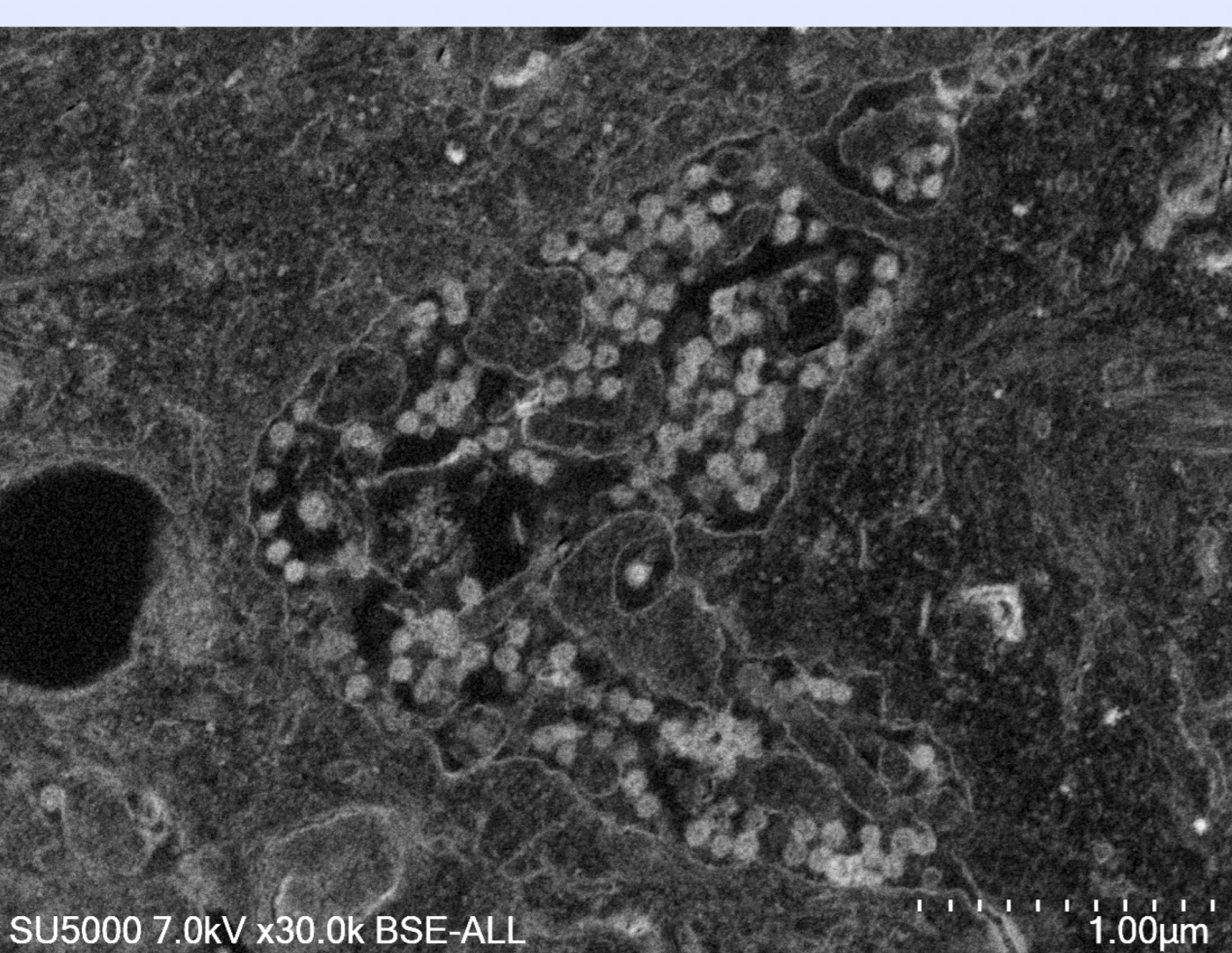
Milestone KOS

+ :
portoir-paniers ergonomiques et économes en produits



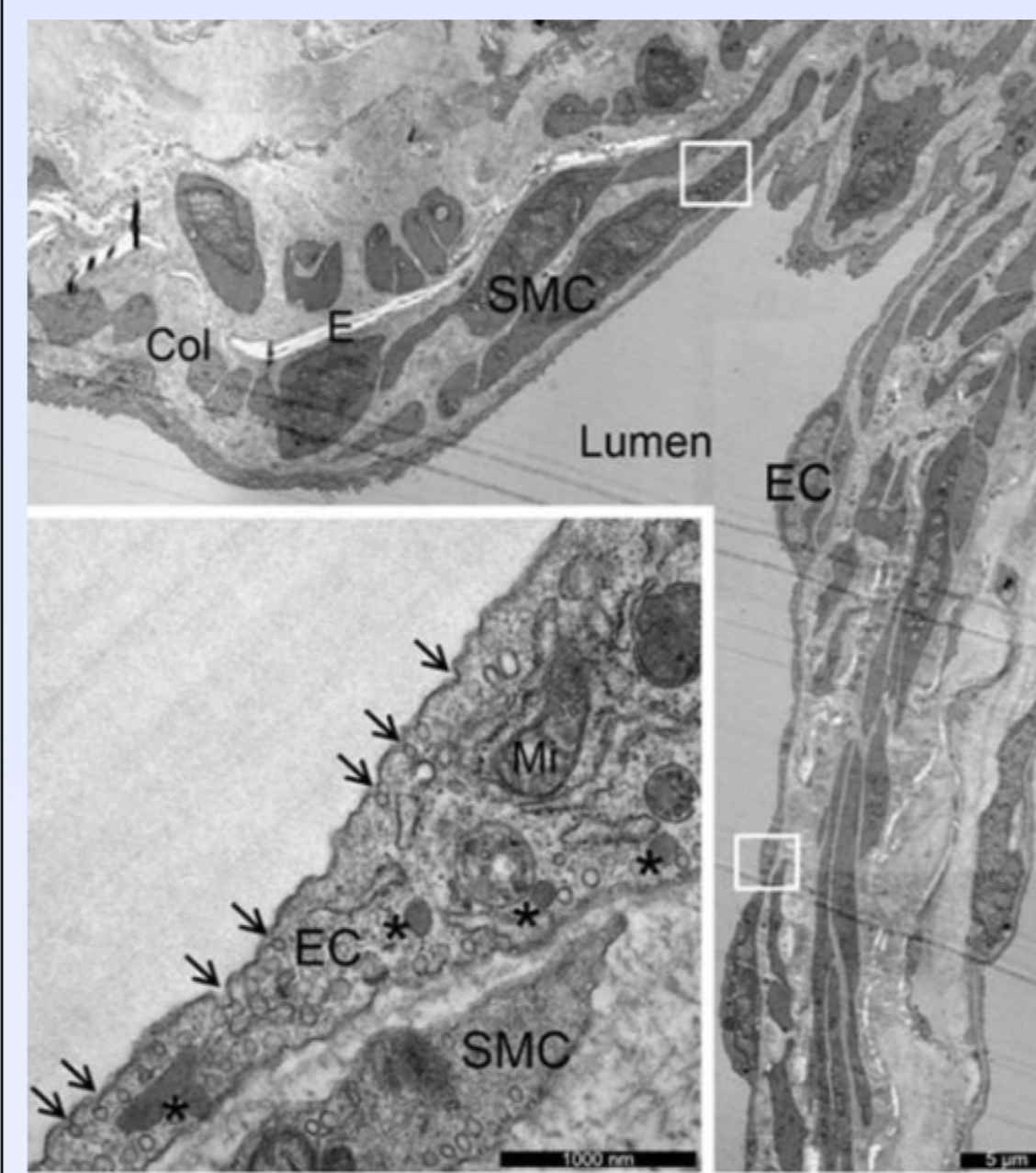
Leica AMW

+ :
carrusel et automatisation



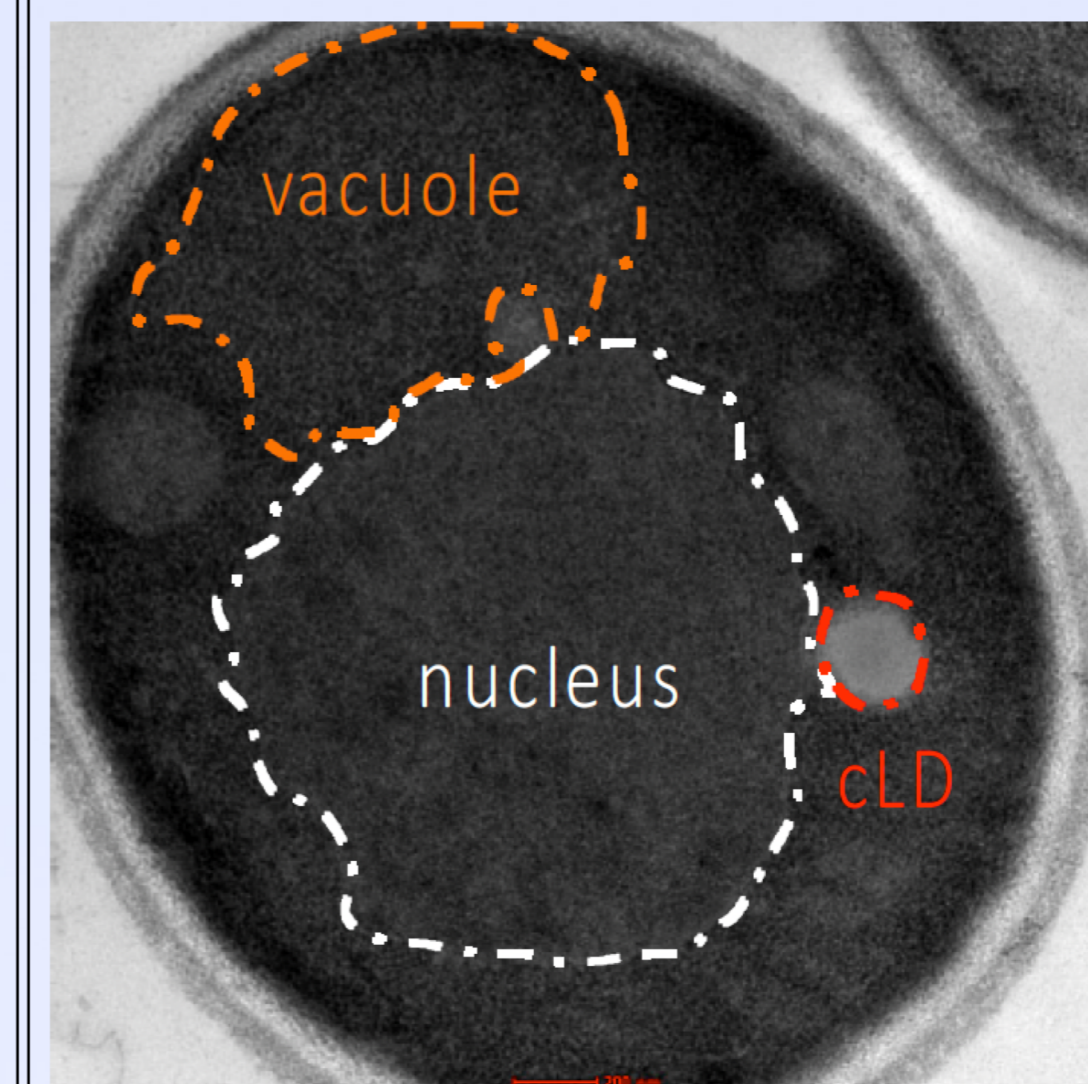
Virus

Osman I.O. et al. Control of CDH1/E-Cadherin Gene Expression and Release of a Soluble Form of E-Cadherin in SARS-CoV-2 Infected Caco-2 Intestinal Cells: Physiopathological Consequences for the Intestinal Forms of COVID-19. Front Cell Infect Microbiol. 2022.



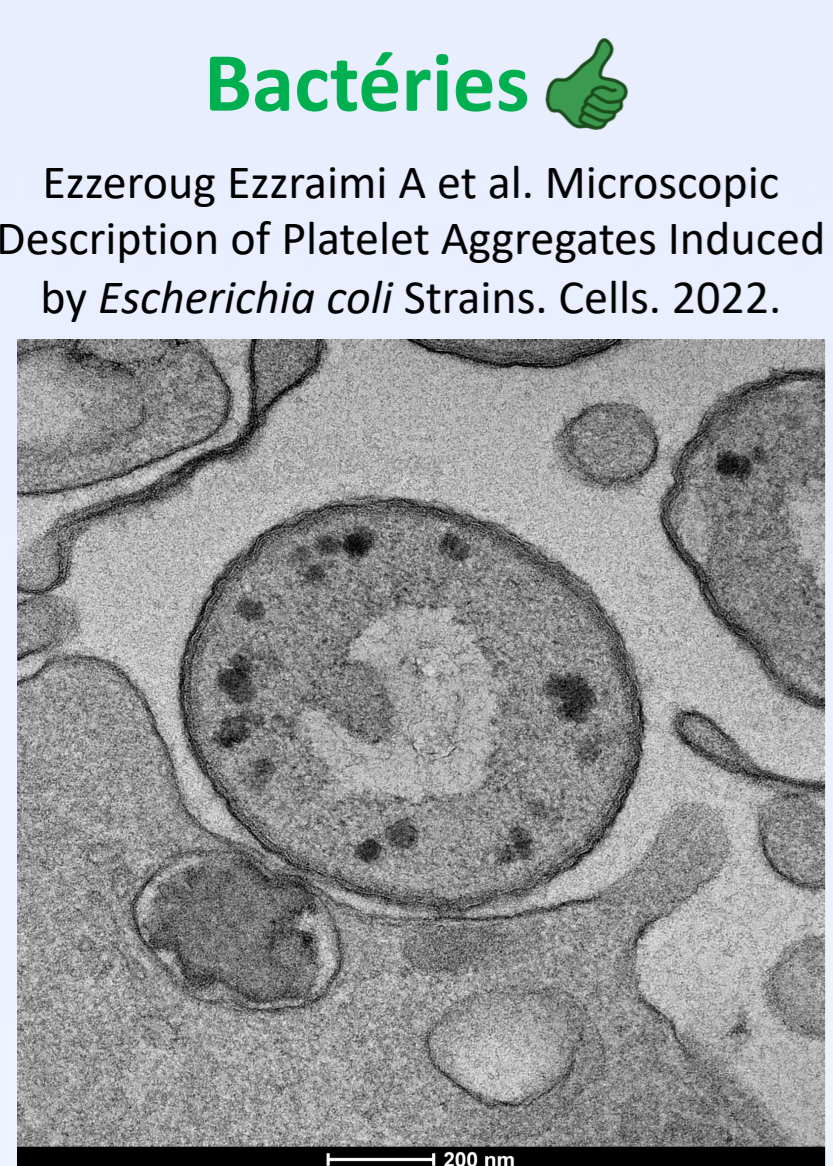
Poumon

Ranchoux B. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. Circulation. 2015.



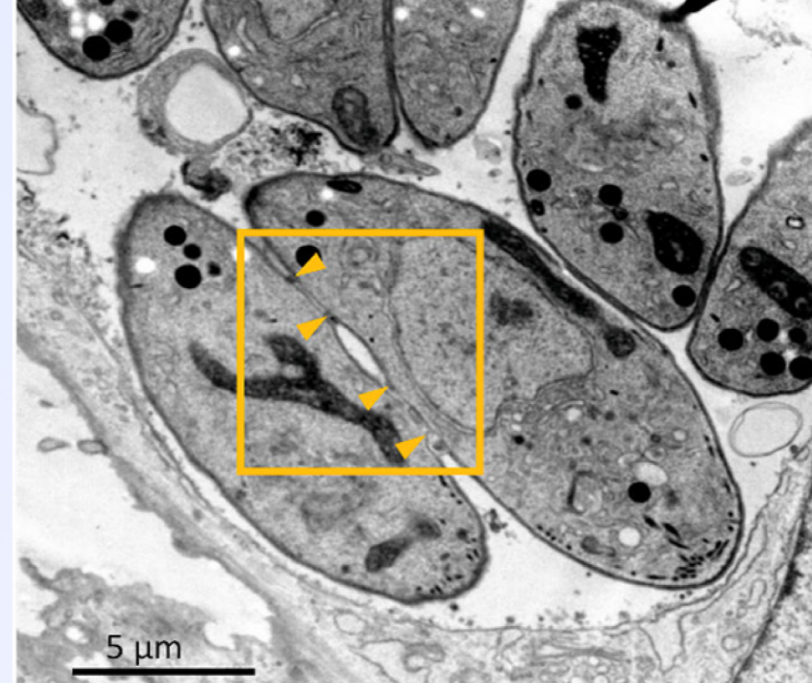
Levure

Kumanski S. et al. Nuclear Lipid Droplet Birth during Replicative Stress. Cells. 2022.



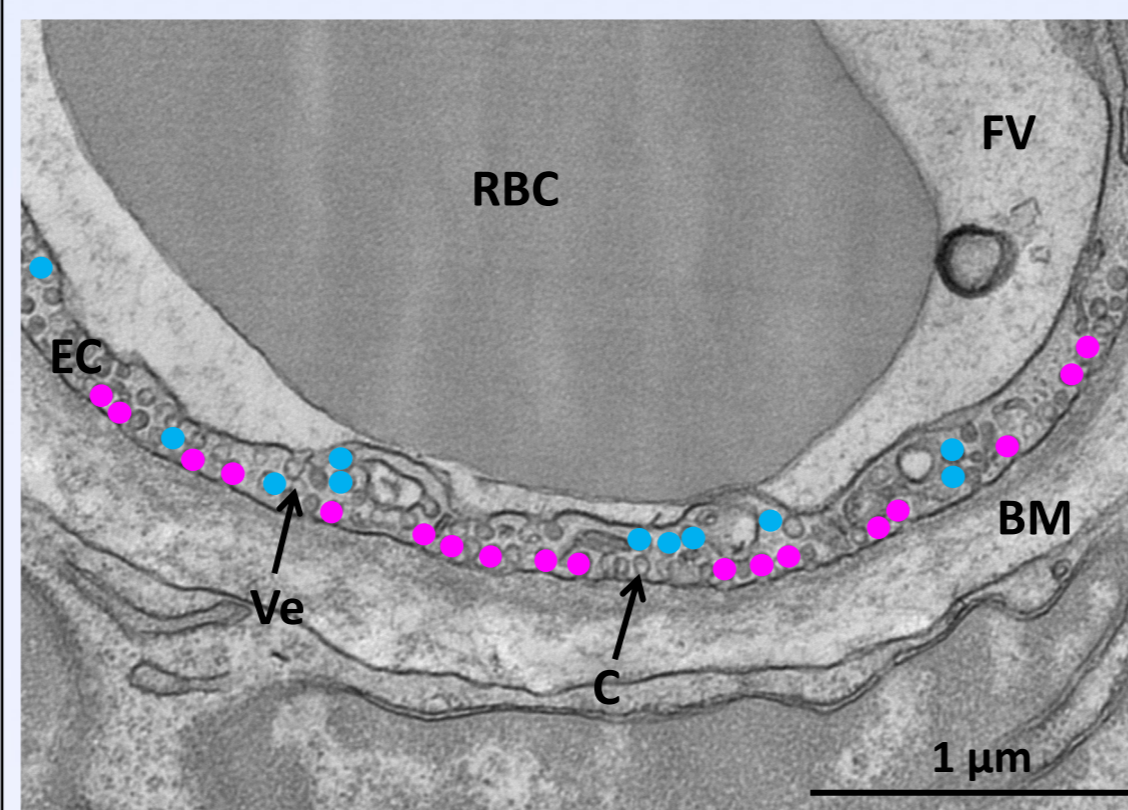
Bactéries

Ezzeroug Ezzaïmi A et al. Microscopic Description of Platelet Aggregates Induced by Escherichia coli Strains. Cells. 2022.



Protozoaires

Renaud E.A. et al. Disrupting the plastidic iron-sulfur cluster biogenesis pathway in Toxoplasma gondii has pleiotropic effects irreversibly impacting parasite viability. J Biol Chem. 2022.



Placenta

Robles M. et al. Effects of dietary arginine supplementation in pregnant mares on maternal metabolism, placental structure and function and foal growth. Sci Rep. 2019.



Végétal

Carpentier A. et al. Microwaves and tea: new tools to process plant tissue for transmission electron microscopy. J Microsc. 2012.

Exemple d'un protocole complet dans le Biowave

J.-P. Baudoin

| Step# | Description | User Prompt (on/off) | Time (H:MM:SS) | Power (Watts) | Temp (°C) | Load Cooler (off/autoloss) | Vacuum Pump |
|-------|--|----------------------|----------------|---------------|-----------|----------------------------|-----------------------------|
| 1 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 2 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 0 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 3 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 4 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 0 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 5 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 6 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 0 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 7 | Glut Fix | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 8 | 0.1M Cacodylate/0.2M Saccharose Buffer | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 9 | 0.1M Cacodylate/0.2M Saccharose Buffer | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 10 | OsO4 1% | On | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 11 | OsO4 1% | Off | 0:2:0 | 0 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 12 | OsO4 1% | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 13 | OsO4 1% | Off | 0:2:0 | 0 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 14 | OsO4 1% | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 15 | OsO4 1% | Off | 0:2:0 | 0 | 50 | Off | vacuum ON 20mm Hg |
| 16 | OsO4 1% | Off | 0:2:0 | 100 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 17 | Water | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 18 | Water | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 19 | 30% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 20 | 50% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 21 | 70% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 22 | 90% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 23 | 96% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 24 | 100% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 25 | 100% ETOH | On | 0:0:40 | 250 | 50 | Off | Off |
| 26 | Resin 25% | On | 0:3:0 | 250 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 27 | Resin 50% | On | 0:3:0 | 250 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 28 | Resin 75% | On | 0:3:0 | 250 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 29 | Resin 100% | On | 0:3:0 | 250 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 30 | Resin 100% | On | 0:3:0 | 250 | 50 | Off | vacuum AUTO 20mm Hg 15s/15s |
| 31 | EPOXY CURE | On | 0:30:00 | 200 | 100 | ON (30deg) | Off |
| 32 | EPOXY CURE | On | 0:45:00 | 375 | 100 | ON (30deg) | Off |
| 33 | EPOXY CURE | On | 0:45:00 | 375 | 100 | ON (30deg) | Off |

Total 2h50

Exemple d'un protocole partiel pour tissus dans le KOS

C. Péchoux

| Etapes | Durée | Température (°C) | Puissance (%) |
|----------------------------------|----------------|------------------|---------------|
| 1 OTE 0,2% (filtré) | 20 min | 37 | 15 |
| rinçage à l'eau | 1 fois x 5min | hors KOS | |
| 2 OsO4 1%, ferrocyanure 1,5% | 20 min | 37 | 15 |
| rinçage à l'eau | 2 fois x 5 min | hors KOS | |
| 3 Ethanol 30% | 5 min | 37 | 15 |
| 4 Ethanol 50% | 5 min | 37 | 15 |
| 5 Ethanol 70% | 5 min | 37 | 15 |
| 6 Ethanol 90% | 5 min | 37 | 15 |
| 7 Ethanol 100% | 10 min | 37 | 15 |
| 8 Acétone | 10 min | 37 | 15 |
| 9 Acétone | 10 min | 37 | 15 |
| 10 Acétone/Epon sans DMAE (1/1)* | 45 min | 45 | 10 |
| 11 Epon sans DMAE | 60 min | 45 | 10 |

Total 3h15 + temps polymérisation classique

de nombreux produits et protocoles sont compatibles : Osmium réduit au Ferrocyanure de Potassium, Rouge de Ruthénium, Vert de Malachite, Acide Tannique, Extraits de Thé Oolong, Thiocarbohydrazide, Acétate d'Uranyle, Aspartate de Plomb ...

pour maîtriser la température :

- Faible puissance : entre 100 et 400 W (< 1000 W des µondes domestiques)
 - Température plafond → arrêt automatique des µondes
 - Cycles On / Off des µondes pendant les étapes sensibles
 - Solutions avant emploi à 4°C
 - Etapes avec durées courtes
 - Systèmes de bain-marie
 - Systèmes de point froid, refroidisseur intégré...
- A adapter (préenrobage agarose low melting point...)

pour sécuriser les manipulations :

- Appareil entièrement sous sorbonne
- Tuyau d'évacuation de l'appareil connecté sous sorbonne
- Contenants scellés pour passages sorbonne - appareil
- Port d'un masque adapté pour passages sorbonne - appareil
- Proscrire les produits « pièges » comme l'Oxyde de Propylène