

Protocole standard d'enrobage d'échantillons de plantes dans l'Epon

Protocole avec double fixation glutaraldéhyde- OsO₄ et enrobage Epon

♦**Fixateurs** : qualité Microscopie Electronique (EM grade)

Glutaraldéhyde : 2 à 4% dans tampon cacodylate de sodium 100 mM pH 7.2 ou dans tampon phosphate 100 mM selon Sörensen

Tetroxyde d'osmium (OsO₄) : 1 à 2% dans H₂O

♦**Etapas de la procédure**

Les échantillons (morceaux de feuilles, tiges, culots de membranes) sont successivement:

- plongés dans la glutaraldéhyde : pendant ~ 4 heures à 4°C
- lavés dans du cacodylate de sodium 100 mM 3 x 15 min, puis toute la nuit à 4°C
- post-fixés à l'OsO₄ 2% pendant 2 heures à 4°C
- de nouveau lavés dans du cacodylate de sodium 0,1 M 4 x 15 min à 4°C
- déshydratés dans l'éthanol (bains de concentrations croissantes) :

Ethanol 30	20 min. à 4°C
Ethanol 50	20 min.
Ethanol 70	20 min.
Ethanol 90	20 min.
Ethanol 100 I	20 min. à t° labo
Ethanol 100 II	20 min.
- Ethanol **100** + Oxyde de propylène (1:1) 20 min.
- Oxyde de Propylène I 20 min.
- Oxyde de Propylène II 20 min.

Etapas d'imprégnation par l'epon : en agitation sur rotatorque ; sous chapelle

- **Epon-** Oxyde de Propylène (1:3) 1 heure
- **Epon-** Oxyde de Propylène (1:1) 1 heure
- **Epon-** Oxyde de Propylène (3:1) 1 heure

puis flacons ouverts toute la nuit

- **Epon seul** ~2 heures en agitation
- Mise en plaquettes avec de l'Epon frais et polymérisation à l'étuve à 60°C pendant 1 (en général suffisant) à 3 jours.

Rem:

1/ Pour des culots ou des échantillons de très petites tailles les enrober dans l'agar avant la déshydratation

2/ Pour des échantillons à parois épaisses : augmenter les temps de passages dans les mélanges Epon - Oxyde de propylène ou préférer le Spurr un peu plus fluide

♦ Préparation de l'EPON

Produits: chez Polysciences sous forme de Kit

- EPON 812 : / résine
 - DDSA: 2-Dodécényl Succinic Anhydride / durcisseur
 - NMA: méthylmadic anhydride / durcisseur
 - DMP30: Tridiméthylaminométhyl phenol / catalyseur
- Autre catalyseur possible: BDMA Benzyldiméthylamine

Recette I : par pesées dans verrerie jetable sous chapelle

Préparation de deux solutions stocks (mélanges A et B) dans flacon de verre avec agitateur magnétique

<u>Mélange A:</u>	EPON 812	: 31g	
	DDSA	: 50g	
	Agiter 1 heure doucement (sans bulles)		
<u>Mélange B:</u>	EPON 812:	50g	
	NMA	: 44,5g	
	Agiter 1 heure (sans bulles)		

Les mélanges A et B peuvent se conserver quelque temps au frigo (ne doivent pas être trop visqueux quand on les sort) à l'abri de l'humidité (flacons fermés hermétiquement).

Préparation de l'EPON final : les pesées se font sous la chapelle

Mélange A:	11.25g	
Mélange B:	13.75g (trait balance jusqu'à 25g)	agiter quelques min doucement
DMP30	: 0.375g	agiter 30 min doucement

Recette II: par volumes dans Falcon sous chapelle

Réchauffer: l'EPON, le DDSA et le MNA à 60°C au bain-marie 1 heure

Dans un tube Falcon de 50 ml mesurer:

- 25,7 ml d'EPON
- 9,3 ml de DDSA
- 16,5 ml de MNA
- Ajouter 1,6 ml de BDMA

Mettre le Falcon en agitation 10 min sur rotatorque, pas trop rapidement pour éviter les bulles.

Imprégnation :

- Epon 1 :1 toute la nuit, flacons fermés
- Epon pur : 3 x 2 heures flacons ouverts

Remarque : si la quantité est trop grande, diminuer les quantités de moitié ou congeler le mélange final à -20°C et dans ce cas sortir le Falcon une à deux heures à T° ambiante avant emploi.