
Protocole de fixation de feuilles d'*Arabidopsis* et d'enrobage dans l'Epon
Michèle Crèvecoeur
Département de Botanique et de Biologie Végétale - Université de Genève – Suisse
michele.crevecoeur@unige.ch

Produits

Glutaraldéhyde EM grade
Phosphate de sodium mono et disodique
Cacodylate de sodium : Fluka 20840
Tween 0.01%
Agarose A 6877 Sigma
Tetroxyde d'osmium OsO₄
Oxyde de propylène
Kit Epon : Fluka 45359
EPON 812 : / résine
DDSA: 2-Dodécényl Succinic Anhydride / durcisseur
NMA: méthylmadic anhydride / durcisseur
DMP30: Tridiméthylaminométhyl phenol /accélérateur

Prélèvement

Sur un morceau de parafilm ou sur une plaque de verre découper à l'aide d'une lame de rasoir propre et de qualité (ex. Gillette souple) des petits morceaux dans le limbe de la feuille de 4 – 5 mm de long sur 2-3 mm de large, dans une goutte de tampon de fixation.
Echantillonnage min. : 6 morceaux de feuille de 6 plantes différentes

1^{ère} Fixation

Aussitôt découpés les échantillons sont plongés dans des petits flacons de verre contenant de la glutaraldéhyde (EM grade) 2,5 % dans tampon cacodylate ou du tampon phosphate 0.1M pH 7.0 et éventuellement du Tween 0.01%. Prévoir 30 x plus de fixateur que de volume d'échantillon.

Les échantillons de feuilles ont tendance à flotter à la surface du fixateur (cuticule, cire, trichomes) même si on a ajouté du Tween. Dans ce cas disposer les flacons sous vide dans un dessiccateur ; faire la vide 5 min et ensuite la rentrée d'air tout, tout doucement. Agiter un peu les flacons. Répéter aussi longtemps que les échantillons flottent. Mettre les flacons au frigo pour la nuit.

Lavages : 4x15 minutes dans le tampon de fixation à 4°C

2^{ème} Fixation : OsO₄ 1% dans le tampon de fixation 2h à 4°C

Lavages : 4 x 15minutes dans le tampon de fixation à 4°C

Déshydratation : éthanol (Fluka 02860)

Ethanol 30 et 50	20 min/ bain à 4°C
Ethanol 70	les échantillons peuvent y rester <u>toute la nuit</u> à 4°C
Ethanol 90	20 à 30 min à 4°C
Ethanol 100	2 x 20 à 30 min à 4°C
Ethanol 100	1 x 20 à 20 min à t°labo
Ethanol- oxyde de propylène 1:1	2 x 20 min à t° labo

Imprégnation :

Oxyde de propylène/ Epon en augmentant progressivement la proportion d'Epon et en mettant les flacons en agitation sur Rotatorque

1 : 3 1h

1 : 1 1h

3 : 1 1h

Epon toute la nuit, sous chapelle, flacons entrouverts

Mise en plaquette

Polymérisation : 24 à 48 heures à 60 °C

Attention

Pour toutes les étapes à l'exception de la déshydratation il convient de travailler sous chapelle avec une bonne ventilation. Et pour les étapes de fixation, d'imprégnation et d'enrobage travailler avec des gants.
