
Protocole de préparation de *Chlamydomonas* en vue de l'examen
au microscope électronique à transmission
Michèle Crèvecoeur
Département de Botanique et de Biologie Végétale – Université de Genève
michele.crevecoeur@unige.ch

Echantillons :

Cellules en culture liquide
4x10⁷ cellules/ ml

Produits :

Glutaraldéhyde EM grade
Phosphate de sodium mono et disodique
Cacodylate de sodium (Fluka 20840)
Agarose (Sigma A 6877)
Tetroxyde d'osmium OsO₄
Oxyde de propylène et éthanol
Kit Epon (Epon 812 ; DDSA ; NMA ; DMP30) : Fluka 45359
Acétate d'uranyle (Sigma 73943)

Etapes du protocole

1^{ère} fixation: glutaraldéhyde 2,5 % - 1 heure à t° labo

Les cellules sont centrifugées à 1.000g pendant 5 min à T° du labo. Le culot est resuspendu à t° du labo dans la glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0.1 M pH 7.0 (laisser couler délicatement le fixateur sur les bords du tube contenant les cellules).

Transférer le mélange dans un tube en verre à fond conique et centrifuger à 500g pendant 5 minutes pour la 2^{ème} fixation.

2^{ème} fixation

Glutaraldéhyde 2,5 % dans tampon cacodylate 0.1M 1h T° labo

Lavages

4 x 20 minutes dans tampon cacodylate 0.1 M à T° labo puis toute la nuit à 4 °C

3^{ème} fixation :

Tetroxyde d'Osmium 1 % dans tampon cacodylate de sodium - 2 heures à T° labo

Lavages T° labo

2 x 20 minutes dans cacodylate 0,1 M
2x 20 minutes dans eau milliQ à T° labo

4^{ème} fixation

Acétate d'uranyle 1 % dans eau milliQ. 1 heure à T° labo en eppendorf

Lavages 3 x 20 minutes avec eau milliQ à T° labo

Agarose

Prise des échantillons dans l'agarose 1,5 % maintenu fluide dans un bain marie à 42°C

Déshydratation

Ethanol 30% 20 min à 4 °C

Ethanol 50% 20 min à 4 °C

Ethanol 70% toute la nuit à 4°C

Ethanol 90 % 20 min à 4°C

Ethanol 100 % 3 bains de 30 min à T° du labo

Imprégnation par l'Epon à T° labo

Ethanol / Oxyde de propylène dans les proportions 1:1 penant 20 min

Oxyde de propylène 2 : bains de 20 min

Oxyde de propylène/ Epon en augmentant progressivement la proportion d'Epon :

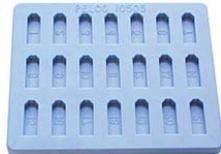
1 : 3 1 h en agitation

1 : 1 2 h en agitation

3 : 1 2 h en agitation

Epon toute la nuit, flacons entrouverts

Mise en plaquette : dans des moules d'enrobage Epon constitués de 21 Loges de 74 x 61 x 6mm épaisseur



Polymérisation : 24 h à 48h à 60°C

Coupes :

A/ Semi fines de 1 µm d'épaisseur au couteau de diamant Histocut

. Coloration : de méthylène – fuchsine basique (voir Page protocoles).

. Observation : Nikon Eclipse 80i microscope.

. Prises de vue : caméra Nikon Digital Color Sight DS-Fi-1

B/ Ultrafines de 80 nm d'épaisseur au couteau de diamant Ultra

. Coloration : 2.5% d'acétate d'uranyle et ensuite au citrate de plomb selon Reynolds

. Observations et prises de vue : microscope électronique à transmission FEI Tecnai G2 Sphera sous tension de 120 kV.