



HAL
open science

Substitution de l'acétate d'uranyle par des sels de lanthanides pour la coloration négative d'échantillons biologiques en microscopie électronique à transmission

Martine Letheule, Marthe Vilotte, Laurent Galio, Christophe Chevalier, Zuzana Krupova, Christine Longin

► To cite this version:

Martine Letheule, Marthe Vilotte, Laurent Galio, Christophe Chevalier, Zuzana Krupova, et al.. Substitution de l'acétate d'uranyle par des sels de lanthanides pour la coloration négative d'échantillons biologiques en microscopie électronique à transmission. RMUI 2018, Nov 2018, Theix, France. 1p., 2018. hal-02791069

HAL Id: hal-02791069

<https://hal.inrae.fr/hal-02791069>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

SUBSTITUTION DE L'ACÉTATE D'URANYLE PAR DES SELS DE LANTHANIDES POUR LA COLORATION NÉGATIVE D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION

Martine Letheule¹, Marthe Vilotte², Laurent Galio¹, Christophe Chevalier³, Zuzana Krupova⁴, Christine Péchoux²

¹ BDR, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas ; ² GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas ; ³ VIM, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas ; ⁴ EXCILONE, 78990, Elancourt, France.

Introduction

Les observations en microscopie électronique à transmission (MET) nécessitent dans une grande majorité des cas l'ajout d'agents contrastants. Ces agents peuvent être inclus au cours de la préparation des échantillons (en bloc) ou déposés sur les échantillons après la coupe. Un des agents couramment utilisé pour contraster les échantillons biologiques est l'acétate d'uranyle (AU). Il est également appliqué comme agent contrastant pour les colorations négatives de macromolécules biologiques comme les protéines, les virus ou les vésicules extra-cellulaires. La coloration négative est une technique rapide et simple pour répondre à de nombreux problèmes biologiques. Cependant, l'utilisation et l'achat de produits radioactifs tel que l'AU est désormais interdit. Pour parer à ce problème de nouveaux produits sont apparus sur le marché dont les sels de lanthanides. Nous avons testé une procédure de contraste alternative à l'aide de deux de ces sels d'acétate comme agents contrastants (le Gadolinium et le Samarium), sur des préparations de nature différente (protéines virales, et vésicules extra-cellulaires (lipides)) et de tailles allant de 10-20 nm à 150-200 nm.

Les 2 substituts ont été testés à différentes concentrations et à différents temps d'application. Les 1ères observations nous ont permis de visualiser nos échantillons en MET dans une gamme de grandissement de 2000 à 20 000.

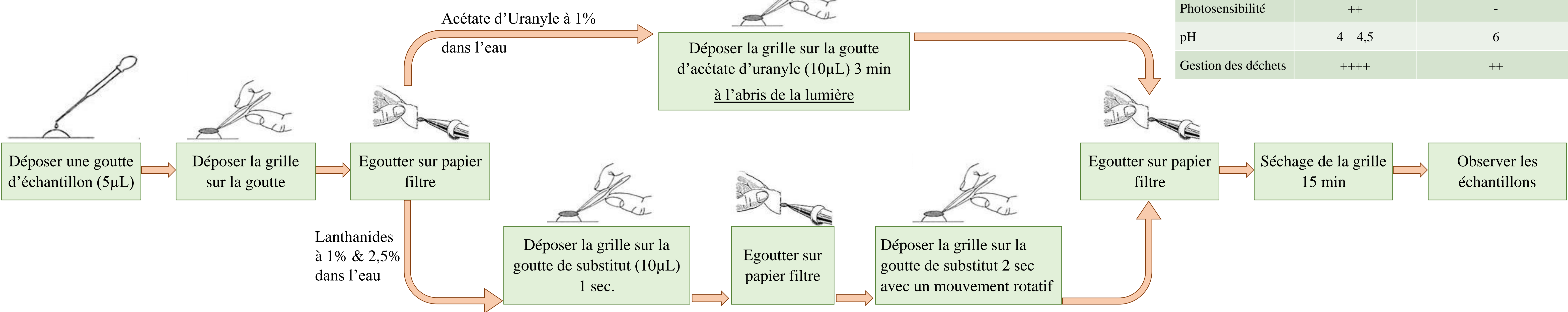
Matériels et méthodes

Echantillons testés : Protéines virales (fibres et anneaux)

Vésicules extra-cellulaires

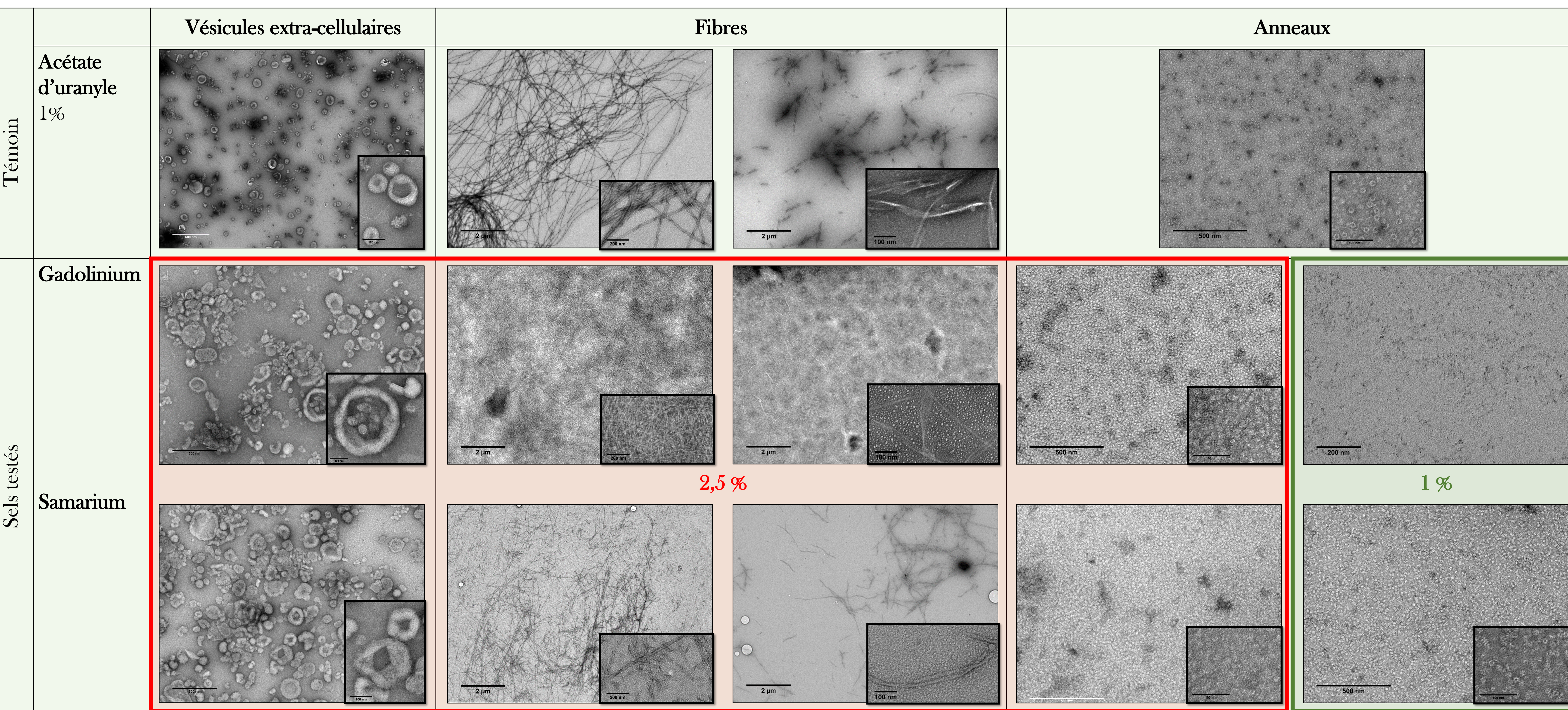
Grilles Formvar/Carbon - 300 Mesh - Copper

Observation : MET Hitachi HT7700 - à 80 KV - Caméra AMT



Caractéristiques des sels	Acétate d'Uranyle	Gadolinium // Samarium	
	AU	Gd	Sm
Radioactivité	+	-	-
Toxicité	+++	++	++
Photosensibilité	++	-	-
pH	4 - 4,5	6	6
Gestion des déchets	++++	++	++

Résultats



Qualité observation

- Faible G	AU +++	Sm/Gd +++	AU +++	Sm++	Gd +/-	AU +++	Sm ++	Gd -	AU +++	Sm/Gd +++	AU +++	Sm+++	Gd ---
- Fort G	AU +++	Sm/Gd + (flou)	AU +++	Sm++	Gd +	AU +++	Sm/Gd ++		AU +++	Sm/Gd + (flou)	AU +++	Sm +++ (flou)	

Conclusion

Bien que les sels d'acétate de gadolinium et de samarium permettent de révéler les structures des échantillons testés, ils sont différents sur la qualité/finesse de la mise au point. Ils constituent une alternative intéressante à l'AU, répondant à l'exigence d'une diminution de la toxicité, ils présentent également l'avantage d'une grande stabilité dans le temps et une absence de photosensibilité, mais aucun ne donne un contraste aussi net que la technique à l'AU.

Ces résultats préliminaires montrent que le choix du contrastant est dépendant de la nature de l'échantillon à observer. Les tests doivent être poursuivis pour définir si un des sels de lanthanide serait mieux adapté en fonction de la taille et de la composition chimique des échantillons et à quelle concentration.

Charlotte A. Scarff, Martin J. G. Fuller, Rebecca F. Thompson, Matthew G. Ladaza (2018). Variations on negative stain electron microscopy methods: Tools for tackling challenging systems, JOVE, 132, 1-8 ; Naoki Hosogi, Hideo Nishioka, Masamichi Nakakoshi (2015). Evaluation of lanthanide salts as alternative stains to uranyl acetate, Microscopy, 14, 1-7 ; Masamichi Nakakoshi, Hideo Nishioka, Eisaku Katayama (2011). New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate, Journal of Electron Microscopy 60(6): 401-407