

Uranyle-Less, nouveau contrastant en microscopie Electronique, substitut à l'acétate d'Uranyle.

Nacer Benmeradi^{1*}, Bruno Payré² et Laura Bosc¹ et Samia Souai¹
Delta Microscopies sas, Laboratoire R&D - 22 b route St Ybars 31190 Mauressac France
² *CMEAB Faculté de Médecine Rangueil, 133 Route de Narbonne, 31400 Toulouse*

*nacer.benmeradi@deltamicroscopies.com; Téléphone : 0561736014; Fax : 0561807853

www.uranyless.com

1. INTRODUCTION

L'uranyLess est un nouveau contrastant pour la microscopie électronique en transmission, pour vos coupes ultrafines ou colorations négatives. Il remplace l'Acétate d'Uranyle, interdit à la vente à cause de sa toxicité et des problèmes d'élimination de ses déchets.

Le matériel biologique très peu dense aux électrons, est traité depuis plus de soixante ans par des additifs contrastants comme l'acétate d'uranyle. Les microscopistes l'ont élu comme un élément incontournable dans la préparation des échantillons biologiques en vue de l'analyse ultrastructurale.[1,2].

Toutefois, la réglementation récente sur les matériaux radioactifs, restreint sévèrement son utilisation même à des fins purement scientifiques. Depuis, plusieurs équipes ont remis à l'honneur des protocoles à base de produits substitués peu toxiques et surtout non radioactifs comme: l'extrait de thé d'Oolong [3], *platinum blue* [4], ou récemment le Gadolinium [5].

2. RESULTATS

Ce produit se veut une alternative de substitution à l'acétate d'uranyle dans le protocole classique de coloration selon Reynolds (1963). Il a été testé sur plusieurs tissus biologiques (animal et végétal) en collaboration avec le centre de microscopie électronique de la faculté de médecine de Toulouse (CMEAB). Ce produit versatile peut être utilisé comme contrastant aussi bien sur coupes ultrafines qu'en coloration négative. L'objectif de ce travail est de valider l'efficacité de cette nouvelle solution dans le contraste des coupes ultrafines afin de vérifier si sa capacité contrastante peut remplacer l'acétate d'uranyle.

- Nous présentons nos résultats ultrastructuraux bruts sans aucun traitement d'image.

Préparation des échantillons:

Des essais ont été fait sur du matériel biologique préparé selon **un protocole unique** et classique aussi bien pour le tissu animal que Végétal.

1- Fixation Glutaraldehyde 2% dans un tampon phosphate 0,2M pH 7,4 (2h)

2- Lavage dans un tampon suivit d'une post Fixation osmique 1% également dans un tampon phosphate 0,2M pH 7,4.

3- Apres déshydratation éthylique, les échantillons ont été imprégnés puis inclus dans un mélange résine Type : Epon/araldite.

4- des coupes ultrafines de 80 nm sont déposées sur des grilles cuivre 200 mesh.

5- **Les coupes ont subi un double contraste « UranyLess »** suivi par citrate de plomb selon Reynolds.

La grille portant la coupe est mise à flotter sur une goutte d'UranyLess **durant 1 à 2 mn** (à l'air et à la lumière) puis rincée soigneusement à l'eau distillée, puis séchée sous une lampe avant de subir le deuxième contraste au **citrate de plomb durant 1 à 2 mn.**

Nos essais ont montré que le citrate de plomb renforce le contraste [1,2].

L'UranyLess ne nécessite pas son utilisation à l'abri de l'air ou la lumière, il est stable et ne s'oxyde pas. Il est recommandé toutefois de le filtrer ou de le centrifuger avant son emploi. Il est très proche d'un pH neutre, 6,4 à 6,8, cela permet son utilisation en coloration négative sans perturber l'organisation de structures comme les liposomes, polymères et macromolécules sensibles à pH.

3. CONCLUSION

Nous avons testé l'UranyleLess sur plusieurs tissus comme: l'Intestin, le muscle squelettique et cardiaque, le foie, le rein, la glande surrénale, le nerf, la culture cellulaire ainsi que des tissus végétaux, feuille Persil, racine de rosier et également en coloration négative sur des bactériophages et des bactéries. L'UranyleLess est efficace dans sa capacité à contraster tout type de matériel biologique et **son affinité est hautement reproductible**. La comparaison de nos résultats avec le contraste à l'acétate d'uranyle nous laisse à penser que la qualité de coloration est équivalente.

Les autres substituts à l'acétate d'uranyle utilisés actuellement ont moins de capacité contrastante et moins d'affinité au matériel biologique. Ce manque d'affinité est compensé souvent par des temps de réactions plus long (15 à 45 mn) et des concentrations élevées. Dans ces conditions les structures cellulaires paraissent avec un fond gris homogène qui masque parfois des structures peu denses.

Vous retrouverez toutes les informations techniques concernant ce produit sur un site dédié uranyless.com

REFERENCES

- [1] JJ Bozzola, LD Russell, "Electron Microscopy" 2nd ed, (Jones and Bartlett, Boston) p.124-9.
- [2] MA Epstein, SJ Holt. J Cell Biol **19** (1963), p. 335-6.
- [3] S Sato, *et al.* J Microsc **229**(1) (2008), p. 17-20.
- [4] S Inaga, *et al.* Arch Histol Cytol. **70**(1) (2007), p. 43-9.
- [5] M Nakakoshi, *et al.* J Electron Microsc (Tokyo). **60**(6) (2011), p. 401-7.
- [6] Reynolds ES. J Cell Biol **17**(1) (1963): p. 208-12.

