

La démarche Environnement de la plate-forme MIMA2

La plate-forme MIMA2 s'appuie sur la démarche que le centre de Jouy-en-Josas mène depuis 2010 concernant les aspects environnements (<https://intranet.jouy.inra.fr/Actualites/CRJ-Changement-climatique>). Elle met en œuvre les mesures prises par la commission développement durable, notamment concernant:

1. Le tri, la collecte et le traitement des déchets : qui prend en compte comme critère de choix des prestataires, le fait que les déchets soient valorisés ou recyclés sur le site du prestataire et non pas exportés. La gestion des déchets concerne aujourd'hui les déchets dits industriels (assimilés ordures ménagères, papier, carton, ferraille, déchets d'équipement électriques et électroniques) et les déchets dangereux (produits radioactifs, chimiques, assimilés aux déchets d'activités de soins à risque infectieux).
2. Le remplacement de produits chimiques toxiques par des produits moins nocifs (remplacement de l'acétate d'uranyle par l'extrait de thé Oolong (OTE : Oolong Tea Extract) comme agent contrastant pour le MET)
3. La contribution à la réduction des transports en favorisant notamment le mode visio-conférence pour les réunions afin de limiter les déplacements des personnels et donc réduire le bilan carbone

1. Tri, collecte et traitement des déchets

Les déchets à caractère dangereux produits par la plate-forme concernent les risques chimiques, biologiques / infectieux et les produits radioactifs.

La gestion de ces déchets qui va du tri jusqu'à leur traitement final en passant par le conditionnement, la collecte et le transport est pris en charge par le centre INRA de Jouy-en-Josas (marchés publics). Le choix des prestataires est réalisé en adéquation avec les obligations imposées par la réglementation, mais également dans le but de limiter au maximum l'impact environnemental (proximité des sites de transit et de traitement afin de réduire le bilan carbone, choix en priorité pour les méthodes de valorisation matière ou énergétique, etc.).

Des documents éclairants sur la gestion des déchets sont disponibles sur le fichier *PF_MIMA2_1319_Volet2_Q n° 8.2 Gestion déchets*

- *Déchets chimiques* : Les déchets chimiques sont pris en charge par la société SUEZ RR IWS CHEMICALS. Ils sont ensuite préparés au transport selon les prescriptions de l'ADR¹ pour le Transport des Marchandises Dangereuses, puis acheminés jusqu'à un site de transit/regroupement. Enfin, ils sont envoyés vers des sites de traitement afin d'y être recyclés, valorisés ou éliminés.
- *Déchets d'Activité de Soins à Risques Infectieux et Assimilés* (DASRIA) : Ces déchets sont pris en charge par la société TAIS-VEOLIA qui les traite par incinération avec valorisation énergétique (thermique et électrique). Les déchets « biologiques » présentant des risques infectieux provenant des plateaux de la plate-forme travaillant en milieu confiné L2 sont évacués dans un double confinement dans des Grands Récipients pour VRAC (GRV).
- *Déchets radioactifs* : Ces déchets sont pris en charge par l'Agence Nationale de gestion des Déchets RadioActifs (ANDRA) qui possède plusieurs filières de traitement. Les déchets radioactifs produits sur la plate-forme MIMA2 sont issus de l'utilisation d'acétate d'uranyle pour la microscopie électronique. Cette utilisation est en nette diminution grâce à l'utilisation de l'OTE (voir point 2). A ce jour, les sels d'uranyle sont pris en charge par l'ANDRA dans le cadre d'accords préalables. Récemment, une simplification de la procédure de reprise, sans accord préalable, a été annoncé par l'ANDRA à l'occasion d'une présentation avec l'ASN.

Afin d'optimiser le tri et d'assurer la sécurité des agents impliqués tout au long du circuit que suivent les déchets, le centre INRA de Jouy-en-Josas a rédigé Guide de tri et de conditionnement des déchets chimiques (voir document : *PF_MIMA2_1319_Volet2_Q n°8.2 Gestion Dechets*).

¹ Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route.

2. Remplacement de l'utilisation de l'acétate d'uranyle par l'extrait de thé Oolong (OTE)

L'acétate d'uranyle est un composé chimique légèrement radioactif. Il est habituellement préparé en solution aqueuse à 1 ou 2% pour contraster des échantillons biologiques pour des observations en microscopie électronique en transmission. Dans cet usage, la radioactivité résiduelle est trop faible pour constituer un risque sanitaire tant que l'acétate d'uranyle demeure en dehors de l'organisme ; ce composé est en revanche très nocif par ingestion et par inhalation, ainsi que par contact cutané, présentant de surcroît un risque par effet cumulatif. Par ailleurs, le traitement des déchets est d'un coût élevé (pris en charge par l'IRSN). Les microscopistes ont recherché des alternatives moins toxiques à ce produit en le remplaçant soit par des métaux lourds (mais avec le problème du recyclage) soit par des produits riches en polyphénol tels que l'acide tannique ou l'OTE (Oolong Tea Extract). Ces produits permettent d'obtenir de bons résultats de contraste tout en étant moins voire non toxiques pour l'homme et l'environnement². Le plateau de microscopie électronique à transmission de la plate-forme Mima 2 a montré dès 2011³ l'intérêt de l'utilisation de l'OTE comme agent contrastant (voir poster ci-après) et l'utilise en routine depuis 2012.

Affiche et procédure de gestion des déchets biologiques L2

GESTION DES DÉCHETS BIOLOGIQUES LABORATOIRE L2 (PATHOGÈNES)

Poubelle jaune
DÉCHETS **JETABLES** ayant été en contact ou non avec un agent biologique (plastiques, boîtes de Pétri, etc.)

Boîtes jaunes
DÉCHETS **PERFORANTS** (couteaux piquants)

Poubelle blanche
DÉCHETS **NON JETABLES** ayant été en contact ou non avec un agent biologique (Verrerie fermée (flacons, Erlenmeyers, tubes))

Récupération par l'équipe prépa des sacs PLEINS et FERMÉS
Traitements: Décontamination par autoclavage³
Puis réconditionnement de la verrerie et élimination des jetables par Benne DASRI

* messages quand on de l'équipe prépa, # pas de rebagages « biologique » chimique »

HOW TO MANAGE BIOLOGICAL WASTES IN LABORATORY
Handlings of biological samples (GMO included) of L2 class

Each laboratory L2 is fitted with bins and bags for the following biological wastes

| Colour code | Waste to be reconditioned | Contaminated Disposable material |
|----------------------------------|--|---|
| Bin types | White bin (75 Liters) | Yellow bin (75 Liters) Pipette tubs and boxes |
| Acceptable wastes | Non-disposable waste was or not in contact with a biological agent | Disposable wastes (in contact or not with a biological sample) Sharps (sharp, spiky) |
| Treated wastes by the prepa team | | |
| Bags to be used | Transparent bags «biohazards» | Yellow bags «biohazards» |

How does it work in Laboratories L2

- For simplicity, each type of waste is defined by a simple color code (see table above).
- Each bin is fitted with a bag of the same color to ensure the traceability of the waste when treated and/or eliminated by the prepa team.
- The user will respect the color code: the correct waste in the correct bag (see table above). Mistakes could endanger people treating your wastes
- The prepa team will daily collect the dishes and waste bags if they are :
 - Filled enough - Properly sealed - Secured (no leak or hole in the bag).

| Lab workers | Prépa team |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Once full, seal the bags Put new bags in empty bins. Ask for more bags if needed from the prepa team. Put any faulty or cracked bag in a new bag; check that there are no leaks. | <ul style="list-style-type: none"> Daily round(s) Collect used dishes and full and properly sealed bag only Supply new bags if needed. |

Safety
For safety reasons, all waste not properly confined in sealed bags will not be taken care by the prepa team.

Le service prévention Le directeur d'unité L'équipe préparation/laverie

Création du document : janv-15

² Carpentier A, Abreu S, Trichet M, Satiat-Jeuemaitre B. Microwaves and tea: new tools to process plant tissue for transmission electron microscopy. *J Microsc.* 2012 Jul;247(1):94-105. doi: 10.1111/j.1365-2818.2012.03626.x.

³ Carpentier A, Chat S, Burdin C, Boulé, A, Rivoire. Comment remplacer l'uranyle dans les contrastes: nouveaux et anciens contrastants. *Journées du réseau commun des centres de microscopie (CNRS)*, 2011 Mimizan.

COMMENT REMPLACER L'URANYLE DANS LES CONTRASTES: NOUVEAUX et ANCIENS CONTRASTANTS

Anais Carpentier : Plateforme Imagif, Institut des Sciences du végétal, CNRS, Gif sur Yvette
 Sophie Chat: Plateforme de Microscopie Electronique, Génomique et Physiologie de la Lactation, INRA, Jouy en Josas
 Burdin, C. Boulé, A. Rivoire: Centre Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard, Lyon

Introduction:

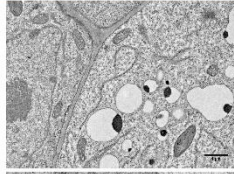
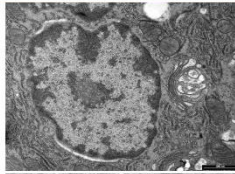
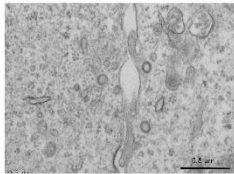
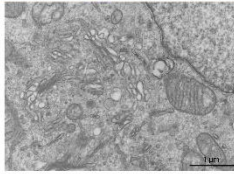
Le contraste classique des échantillons biologiques en MET est en fait un **double contraste Acétate d'uranyle/Citrate de Plomb**. Le principe de ce contraste est basé sur des **réactions ioniques, échange de paires d'électrons des ions métalliques de métaux lourds et denses aux électrons** avec les groupements carboxyles, amines, amides, esters, les groupements phosphate ou autres groupements des acides nucléiques, des protéines, des lipides.

l'acétate d'uranyle (AU) : Le plus gros atome utilisé comme contrastant, il est très efficace car de poids atomique élevé. Ses ions se combinent préférentiellement à l'ADN, mais il réagit bien aussi avec de nombreuses protéines. Dans les membranes, ce sont plutôt les protéines que les phospholipides qui vont réagir.

le citrate de plomb (Pb) : l'utilisation du citrate permet de lier tous les ions Pb, ce qui diminue les risques de précipitation et de contamination. Il réagit bien avec l'ARN, avec les membranes (groupements phosphatidyles) uniquement si une fixation osmique a été effectuée auparavant. Il réagit avec le glycogène et donne des structures en granules denses.

L'objectif d'un contraste multiple n'est pas la spécificité mais l'augmentation de la densité aux électrons des composants cellulaires.

La méthode la plus classique consiste sur coupes en un **premier contraste à l'acétate d'uranyle** dans l'eau ou l'alcool (concentrations variables en fonction de l'échantillon) suivi après rinçages d'un **contraste au citrate de Plomb**. Le terme « en bloc » signifie que l'acétate d'uranyle a été effectué tout de suite après la post-fixation osmique. Le plomb est ensuite fait sur coupes.



AU 0.5% en bloc + Pb sur coupes de cultures (CTu) (C.Tu) (CNRS)

AU 2% en bloc + Pb coupes de glandes mammaires (cellules épithéliales mammaires) (S. Chat, Inra)

AU 2% sur grille + Pb (A. Carpentier, CNRS) Haute résolution de grilles de Microgato service Bio: racines en plantes d'Arabidopsis thaliana

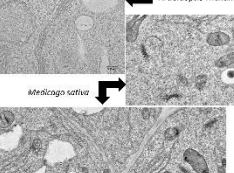
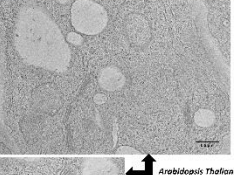
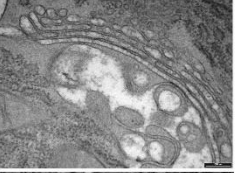
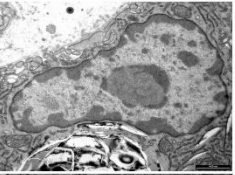
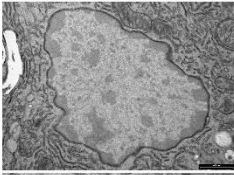
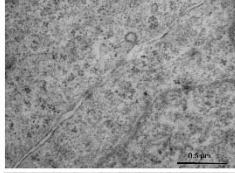
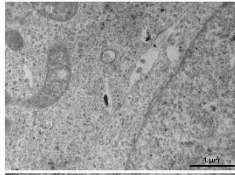
Problématique: Devant les problèmes rencontrés en terme d'approvisionnement et de traitement des déchets pour l'acétate d'uranyle, la communauté des microscopistes cherche d'autres contrastants susceptibles de donner des résultats similaires. L'objet de ce poster est de donner des pistes, à partir d'essais réalisés dans différents laboratoires sur différents échantillons (cultures de cellules animales, glandes mammaires, racines de plantes), avec différents contrastants, connus ou plus récents. Nous présenterons uniquement des photos d'échantillons osmiés car les contrastes sont meilleurs.

LOTE

-Principe: l'extrait de thé Oolong agit de façon similaire à l'acide tannique (réaction des polyphénols par liaison hydrogène avec les liaisons peptidiques, les groupements amines et amides des acides aminés polaires). Mais ses principaux polyphénols ont un PM plus petits que ceux de l'acide tannique, permettant ainsi un contraste plus fin des structures cellulaires et des composés de la matrice extracellulaire (élastine, collagène)

-Sato et al., Med. Electron Microsc. (2003), 36:179-182 - Sato et al., J. Microsc. (2008), 229:17-20

-Méthodes : comme pour l'uranyle: double contraste sur coupes avec OTE à 0,2% dans l'eau (0,05% pour tissu végétal) puis Plomb. En bloc: 0.1%, 0.2% et 0.5% OTE dans tampon (eau pour glandes mammaires) ont été testés, Pb sur coupes



OTE 0.1% 1h en bloc + Pb sur coupes sur cultures (CTu)

OTE 0.2% 1h + Pb sur coupes sur cultures (CTu)

OTE 0.5% en bloc + Pb sur coupes de glandes mammaires (cellules épithéliales) (S. Chat, Inra)

OTE 0.2% 30 min + Pb sur coupes de glandes mammaires (cellules épithéliales) (S. Chat, Inra)

Arabis: OTE 1% 1h + Pb sur coupes Arabidopsis thaliana

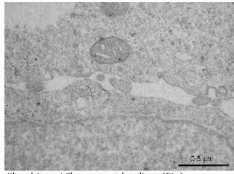
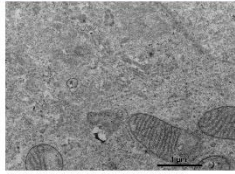
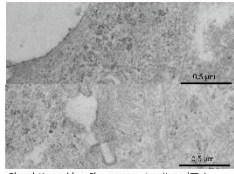
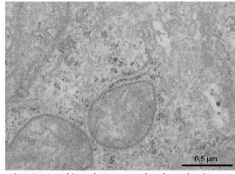
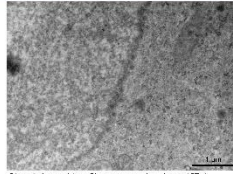
Résultats: bon substitut à l'AU. Pour les cellules le cytoplasme apparaît plus uniformément sombre avec un réticulum lisse moins visible, certains détails sont moins fins qu'avec l'AU. Les membranes sont bien contrastées, de même que les mitochondries, le contraste du noyau est très proche de celui obtenu avec l'AU. Pour le tissu, les résultats sont globalement les mêmes à part pour le noyau: les membranes nucléaires sont fortement contrastées, le nucléole est particulièrement bien visible, mais les détails de la chromatine sont moins fins. Pour le végétal, mêmes résultats mais les contrastes semblent encore plus marqués. Les différences entre contrastes OTE dans l'eau ou dans le tampon ne sont pas flagrantes.

Le Bleu platine ([Pt₄(NH₃)₄(C₆H₅O₂)₄)]⁴⁺

-Principe: Composé polymérique de bleu profond dans lequel le Platine est lié aux groupements amides, solution aqueuse de cis-Pt et thymidine dense aux électrons, utilisée à l'origine comme agent anti-tumoral

-Inaga et al., Arch. Histol. Cytol., (2007) 70(1):43-49

-Méthodes: solution de base diluée au 1/10 dans l'eau (environ 0.6%), non filtrée. En bloc: 10 min après post-fixation osmique; Sur coupes: 10 min



Bleu platine in bloc + Pb sur coupes de cultures (CTu)

Bleu platine in bloc + Pb sur coupes de cultures (CTu)

Bleu platine en bloc + Pb sur coupes de cultures (CTu)

Bleu platine et Pb sur coupes de cultures (CTu)

Bleu platine et Pb sur coupes de cultures (CTu)

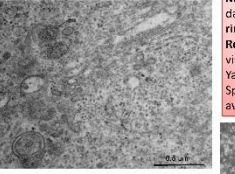
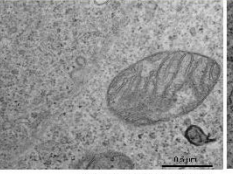
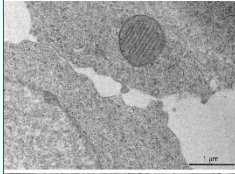
Résultats: Bonne densité du cytoplasme, du RER, du noyau, des nucléoles, Golgi difficile à voir. Contraste comparable à l'AU mais dépôt de grains de platine parfois trop visibles en particulier au niveau des membranes, des ribosomes et du glycogène.

-Avantages: Rapide et fiable, non toxique, contrastant utile aussi en MEB, marche également en coloration négative -Inconvénients: difficulté d'approvisionnement (pas disponible en France?), gestion des déchets?

L'acide phosphotungstique (APT)

-Principe: comme l'uranyle, élément lourd et dense aux électrons, réaction chimique avec des groupements amides, esters, hydrocarbures saturés etc...

-Méthode : sur coupes uniquement: 5% dans l'eau sans ajustement de pH, 1h suivi du Pb



APT + Pb sur coupes de cultures (CTu)

APT + Pb sur coupes de cultures (CTu)

APT + Pb sur coupes de cultures (CTu)

Résultats: contrastes assez fins, mitochondries et noyau bien nets, ainsi que les membranes et le Golgi, RER parfois difficile à distinguer
Avantages: non toxique, présent dans beaucoup de laboratoires car utilisé en coloration négative
Inconvénients: long

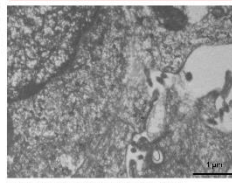
Conclusions

Bien que tous les contrastants utilisés soient capables de révéler des structures, ils sont différents sur certains détails et aucun ne donne un contraste aussi net que la technique AU+Pb. L'OTE est une alternative nouvelle et « naturelle » mais qui, à notre avis, force le cytosol et rend les contrastes moins nets que l'AU. Le Bleu Platine quant à lui donne un contraste plus relevé mais certains organites comme le Golgi sont plus difficilement repérables, tandis que les membranes sont très fortement marquées. C'est un produit qui pour l'instant est difficile à trouver. L'APT donne de bons résultats mais encore un peu faibles et le marquage est long. Quant au permanganate, il est à déconseiller avec l'Epon et à manipuler avec précaution car il force très vite les coupes. Tous ces essais n'ont été faits qu'à certaines concentrations et d'autres essais plus poussés pour le Bleu Platine et l'APT seraient les bienvenus.

Le permanganate de potassium (KMnO4)

Méthode: sur coupes de cultures: 0,5% dans tampon phosphate 0,15M 1 min, rinçage acide citrique 0,05% 10 s puis Pb

Résultats: Trop de contraste, organites peu visibles, noyaux très marqués. Selon Yamaguchi et al. meilleur contraste sur Spurr ne contenant pas de MNA car noircit avec le MNA (présent dans Epon)



KMnO4 + Pb sur coupes de cultures (CTu)