

Introduction:

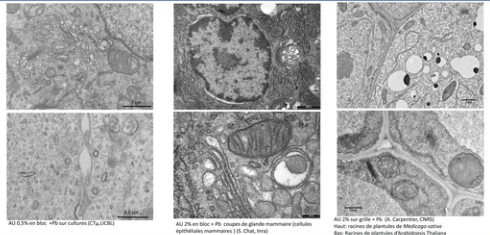
Le contraste classique des échantillons biologiques en MET est en fait un **double contraste** **Acétate d'uranyle/Citrate de Plomb**. Le principe de ce contraste est basé sur des réactions ioniques, échange de paires d'électrons des ions métalliques de métaux lourds et denses aux électrons avec les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

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.

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 granales 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.



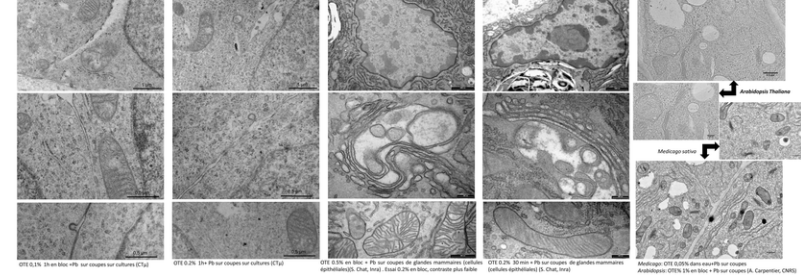
Problématique: Devant les problèmes rencontrés en terme d'approvisionnement et de traitement des déchets pour l'acétate d'uranyle, la communauté des microscopistes cherche d'autres contrastants susceptibles de donner des résultats similaires. L'objet de ce poster est de donner des pistes, à partir d'essais 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.

L'OTE

Principe: l'extract de l'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)

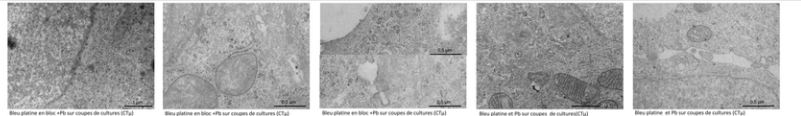
Sato et al., Med. Electron Microsc. (2003), 36:179-182 **Sato et al., J. Microsc.** (2008), 229:17-20

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



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 [Pt₂(NH₄)₂C₁₄H₁₄O₁₁]²⁺
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



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 glycoène.

Avantages: Rapide et fiable, non toxique, contrastant utile aussi en MEB, marche équilibrée 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

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

APT + Pb sur coupes de cultures (CTa)

Le manganate 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, organelles peu visibles, noyaux très marqués. Selon Yamaguchi et al. meilleur contraste sur Spurr ne contenant pas de MMA car noircit avec le MMA (présent dans Epon)

KMnO₄ + Pb sur coupes de cultures (CTa)

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.