

## L'identification de molécules et structures en Microscopie Electronique en Transmission

Jessica Marion, Michaël Trichet

#### ▶ To cite this version:

Jessica Marion, Michaël Trichet. L'identification de molécules et structures en Microscopie Electronique en Transmission. École thématique. France. 2018. hal-02870140

#### HAL Id: hal-02870140 https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02870140

Submitted on 16 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.

# L'identification de molécules et structures

# en Microscopie Electronique en Transmission

- La cytochimie
- L'immunomarquage
  - Les outils
  - La préparation des échantillons
  - Exemple d'application

#### Jessica MARION

Imagerie-Gif I2BC Gif-sur-Yvette





#### Michaël TRICHET

Service de Microscopie Electronique Institut de Biologie Paris-Seine Sorbonne-Université



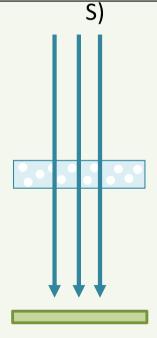


## La création du contraste

Échantillon biologique Non contrasté



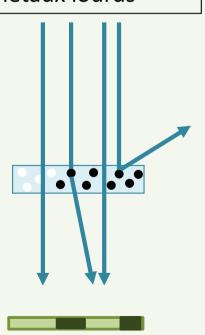
Atomes légers (C, O, N, H,



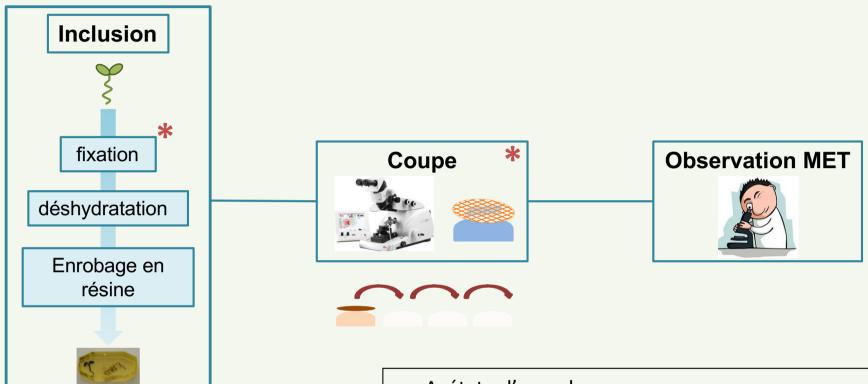
Échantillon biologique Contrasté



Marquage avec des métaux lourds



## Les différents contrastants



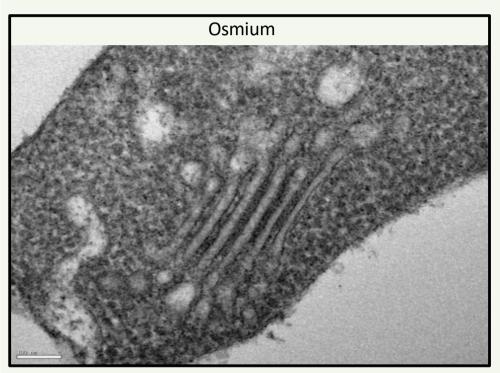
\* Contraste des coupes sur grille

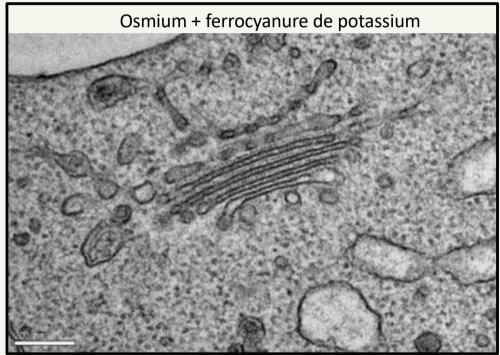
\* Post-fixation ou contraste en bloc

- Acétate d'uranyle
- Citrate de plomb
- OTE (oolong tea extract)
- sels de lanthanides (gadolinium, lanthane et samarium)
- Osmium
- Osmium + ferrocyanure de potassium
- Osmium + acide tannique
- Osmium + Zinc + iode
- Acétate d'uranyle

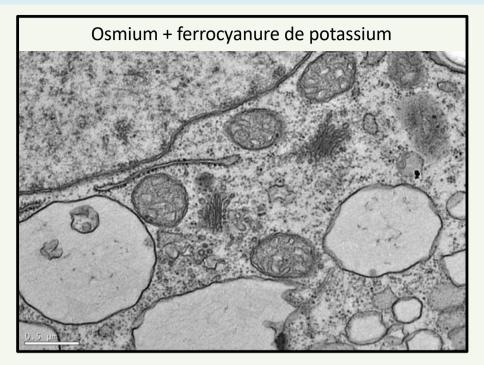
# **Exemples**

## Augmente contraste des membranes

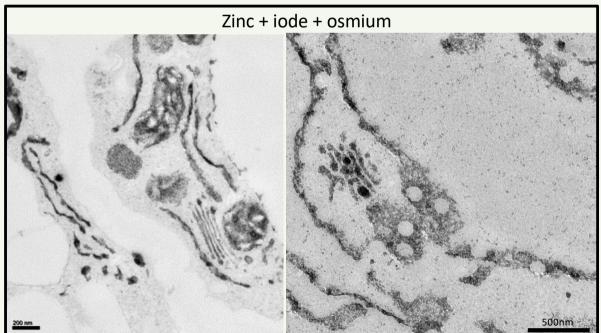




## **Exemples**



Marquage dense du RE



#### La cytochimie

## Mise en évidence de composés spécifiques

Des polysaccharides complexes (pectine) → rouge de ruthénium

Des glycoprotéines → acide phosphotungstique

Des polysaccharides → test du PaTag

D'enzymes: ex. péroxydase, phosphatase...

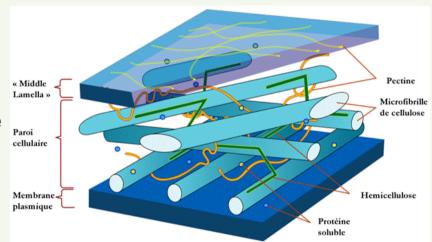
. . . . .

Test du PATAg

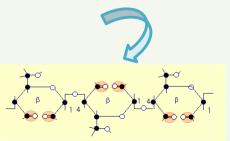
La cellulose

Periodic Acid- Thiocarbohydrazide-Argent proteinate

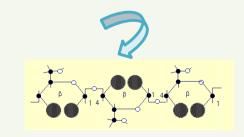
Exemple : la paroi végétale



Acide périodique



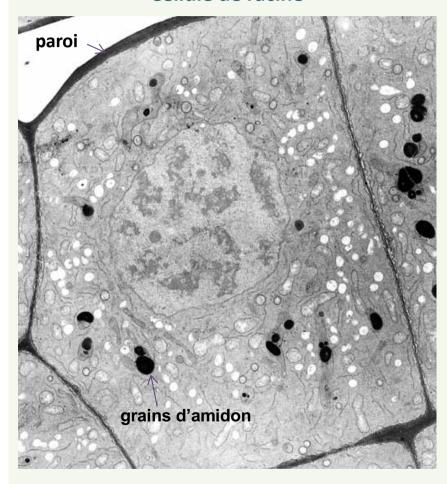
Thiocarbohydrazide et protéinate d'argent

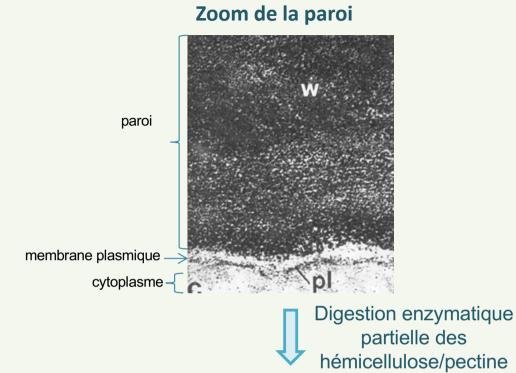


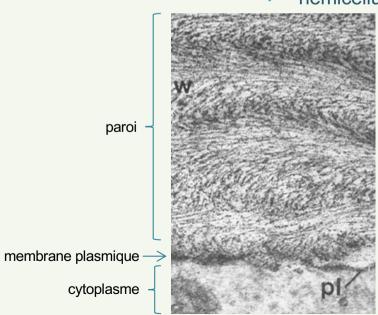
## Mise en évidence de composés spécifiques

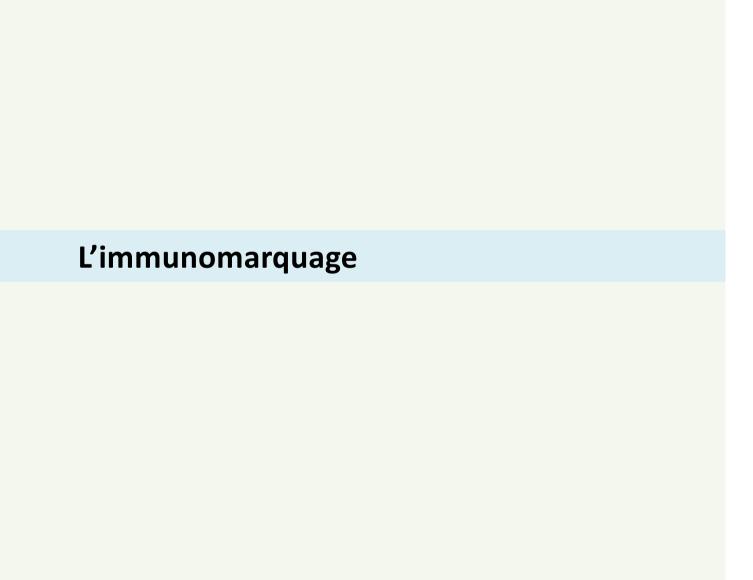
Test du PATAg

#### Cellule de racine









## Les outils de l'immunomarquage

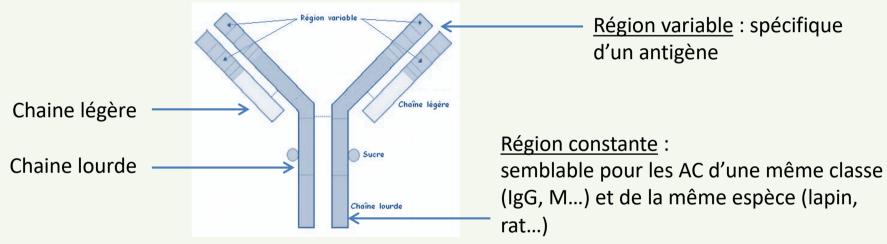
## Le principe

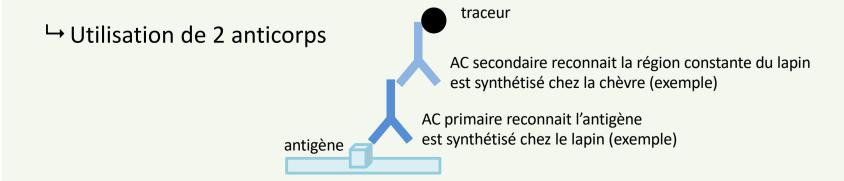
Localiser au niveau subcellulaire un antigène grâce à un anticorps spécifique.

Utilisation de composé dense aux électrons.

Préserver l'ultrastructure et l'antigénicité cellulaire.

## Les anticorps





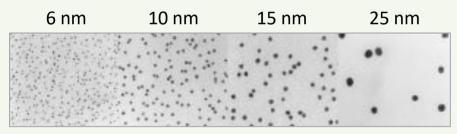
## Les outils de l'immunomarquage

#### Les traceurs

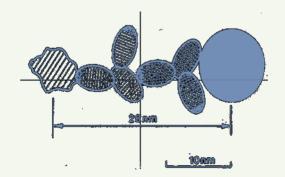
élément couplé à l'AC llaire et permettant de le détecter au MET

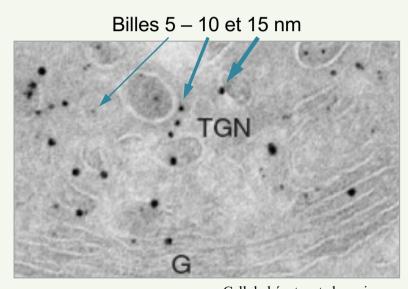
#### • Bille d'or colloïdal :

- Couplage stable par adsorption
- Sphérique
- Dense et précis
- Tailles variées (multi-marquages)





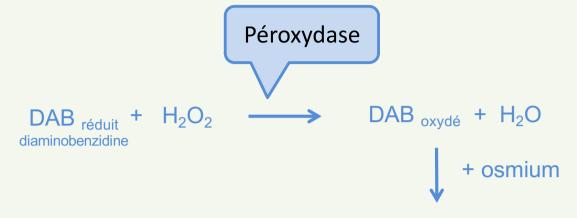




Cellule hépatocyte humaine. G: Golgi, TGN: Trans Golgi Network Slot & Geuze, 2007

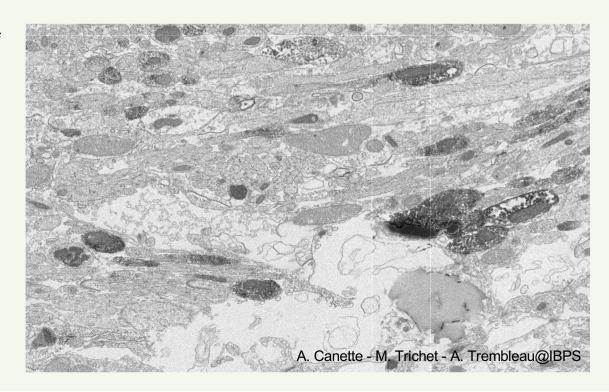
## Les outils de l'immunomarquage

#### • Enzyme :



Composé noir, dense aux électrons

Ac anti-récepteur olfactif
Bulbe olfactif murin



## Exemple de protocole d'immunomarquage

## Les différentes étapes

| Limitation<br>du bruit de<br>fond | PBS-Glycine 100mM       | Blocage des groupements aldéhydiques du fixateur |  |
|-----------------------------------|-------------------------|--|--|
|                                   | PBS-BSA 1 %             | Blocage des sites non spécifiques                |  |
|                                   | Anticorps primaire      |  |  |
|                                   | PBS<br>PBS-BSA          | lavages  |  |
|                                   | Anticorps secondaire    |  |  |
|                                   | PBS<br>H <sub>2</sub> O | lavages  |  |

#### L'immunomarquage

## La préparation d'échantillon

#### Immunomarquage nécessite :

Une préparation d'échantillons adaptée

- Accessibilité aux antigènes
- Préservation antigénicité et ultrastructure

#### **Fixation**

#### Paraformaldéhyde

#### Glutaraldéhyde

- Fixation faible des protéines
- Fixation forte des protéines

Préserve l'antigénicité

Altère l'antigénicité

0 - 1,5 % Ultrastructure 1 - 2,5 % 4 % Immunocytochimie 0,1 %

#### **Cryofixation - cryosubstitution**

- Fixation ≈ instantanée
- **\(\)** artefacts fixation/déshydrat<sup>\(\)</sup> /inclusion
- Préserve l'ultrastructure
- Préserve l'antigénicité

#### **Post-fixation**

#### Tétroxyde d'osmium

- Fixation forte lipides insaturés
- Altère l'antigénicité

Ultrastructure 1 % Immunocytochimie 0 %

#### Inclusion en résines

#### **Epoxy**

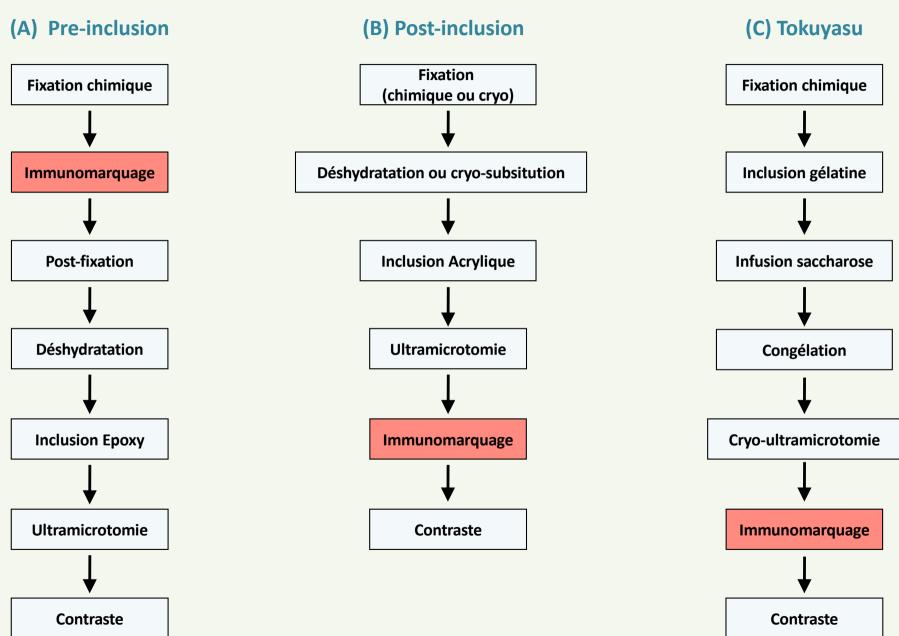
- Inerte
- Préserve l'ultrastructure
- Masquage antigènes

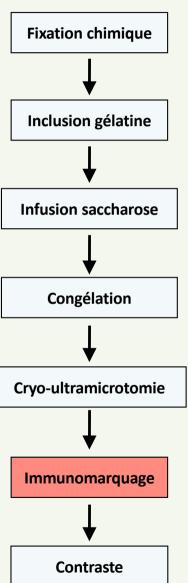
#### **Acrylique**

- Extraction
- Préserve l'antigénicité
- Altère l'ultrastructure

Inclusion à basse température

## La préparation d'échantillon



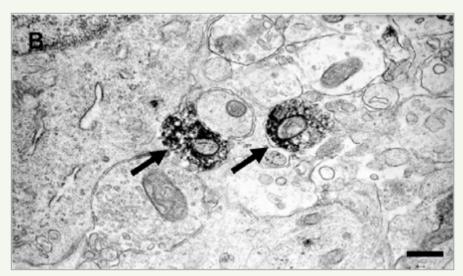


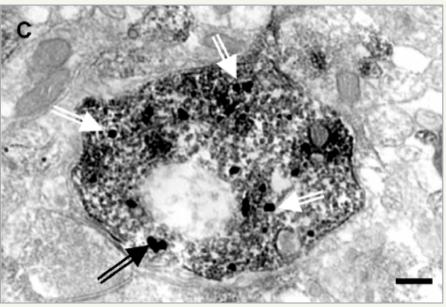
## (A) Pre-inclusion

#### Coupe de cerveau de rat

Urotensin-II-related peptide (URP): immunoperoxydase et gonadotrophin-releasing hormone peptide (GnRH): immunogold

Egginger et coll., 2011





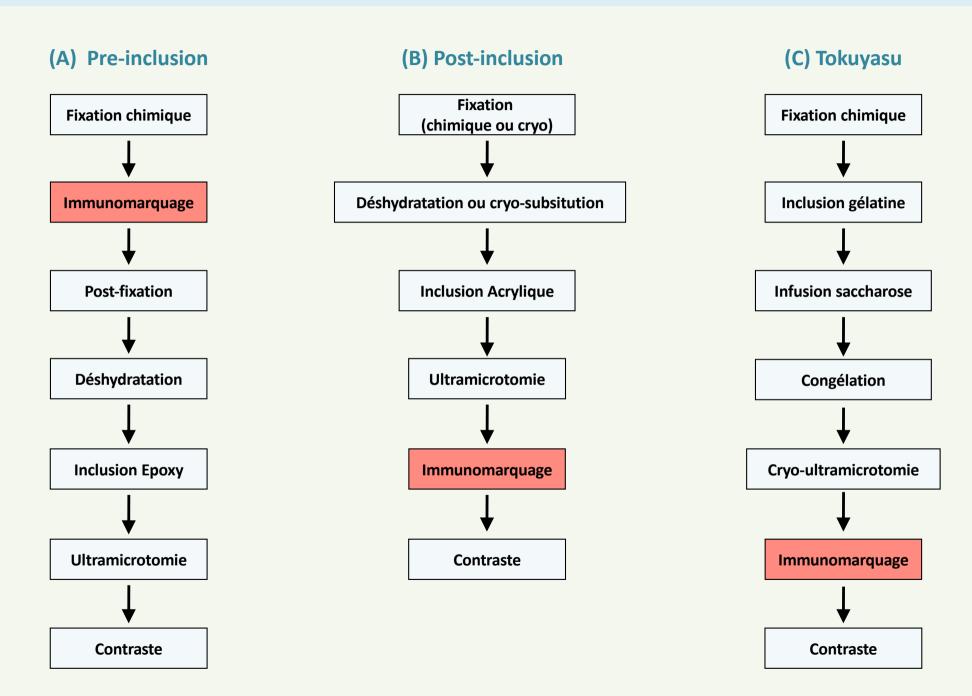
#### Points (+) du pre-embedding :

- Fixation membranes (Osmium)
- Résine époxy (inerte)
- Adapté pour tissus difficiles à cryofixer (exemple : dissection longue)
- Conditions comparables à IF

#### Points (-) du pre-embedding :

- Fixation aldéhydique faible
- Perméabilisation membranes
- Accessibilité restreinte antigènes par Ac-gold
- Diffusion du marquage
- Multi-marquages compliqués

## La préparation d'échantillon

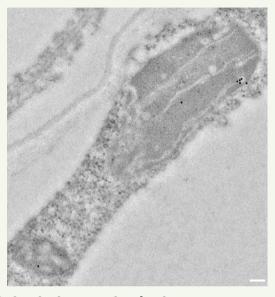


## (B) Post-inclusion

#### Racine d'A.thaliana

AC DGDG (galactolipide)- marquage plaste et mitochondrie

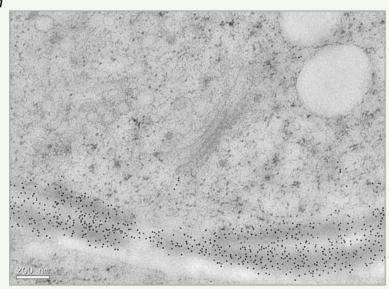
J. Marion



#### Grain de blé, cellule de la couche à aleurone

AC anti glucane - marquage paroi et golgi

J. Marion





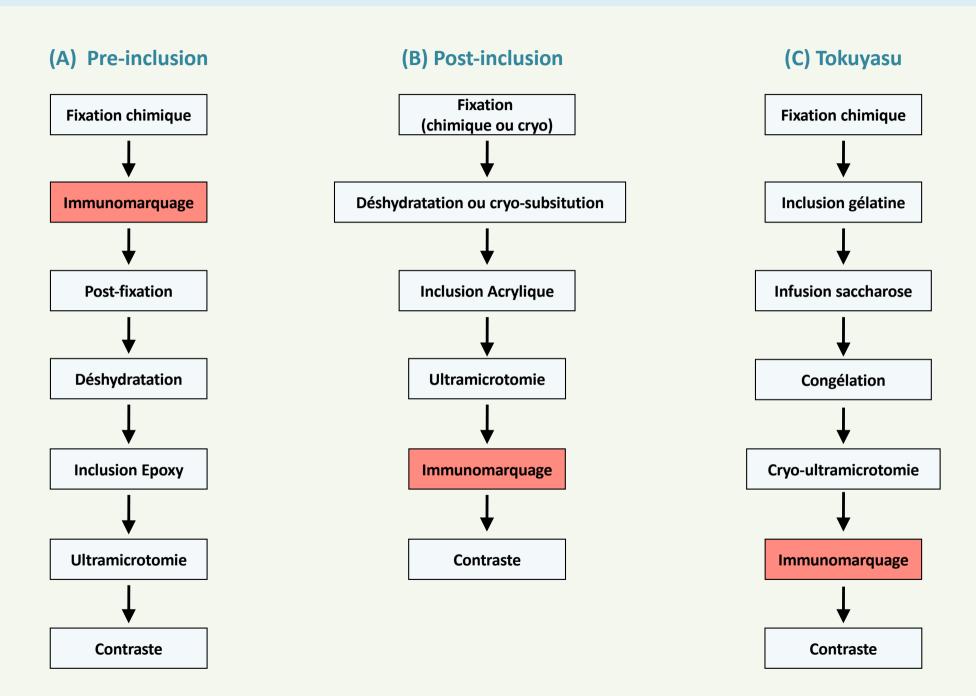
#### Points (+) du post-embedding :

- Compatible cryofixation haute-pression (Ø aldéhydes)
- Adapté aux tissus difficiles d'accès par Ac
- Multi-marquages (tailles billes Or)

#### Points (-) du post-embedding :

- (Fixation aldéhydique faible)
- Ø osmium : extraction et contraste faible des membranes
- Résines acryliques : extraction constituants
- Restreint aux antigènes abondants

## La préparation d'échantillon



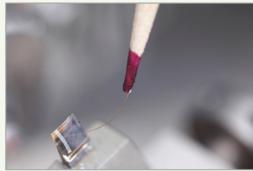
## (C) Méthode de Tokuyasu

#### Principe du Tokuyasu:

Durcir échantillon par le froid après cryoprotection



Chambre cryoultramicrotome

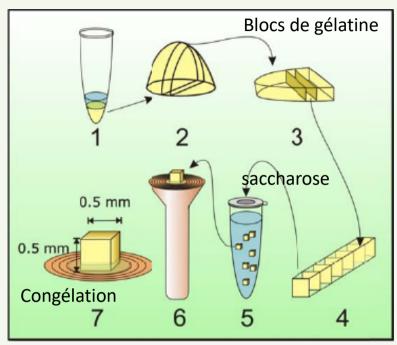


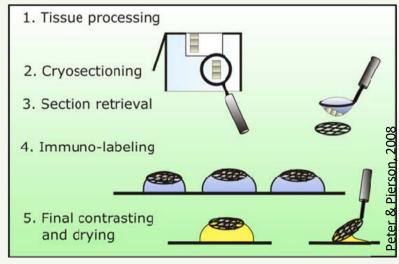
Cryo-section (-120° C)



Récupération des coupes

#### **Préparation échantillon:**



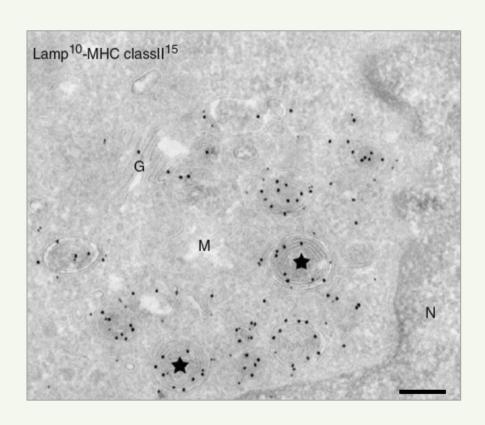


#### L'immunomarquage

## (C) Méthode de Tokuyasu

#### Lymphocyte humain

AC anti lamp1 et AC anti CMH- lysosome *Slot & Geuze, 2007* 



#### Points (+) du Tokuyasu :

- Déshydratation faible (80% et Ø solvant)
- Ø résines
- Accessibilité antigènes +++
- Rapide (3 jours)

Préservation optimale antigénicité et ultrastructure

#### Points (-) du Tokuyasu:

- Fixation chimique
- Orientation échantillon compliquée
- Cryo-section (dextérité, patience)
- Artefacts (déchirures, compression)
- Existe structures peu/pas visibles (cytosquelette)

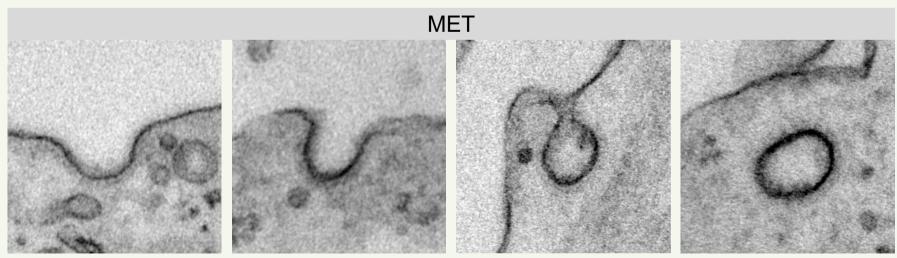
# Membrane protrusion powers clathrin-independent endocytosis of interleukin-2 receptor

Cyril Basquin<sup>1,2,‡</sup>, Michaël Trichet<sup>3,†</sup>, Helena Vihinen<sup>4,†</sup>, Valérie Malardé<sup>1,2,§,†</sup>, Thibault Lagache<sup>5,2,†</sup>, Léa Ripoll<sup>1,2,¶</sup>, Eija Jokitalo<sup>4</sup>, Jean-Christophe Olivo-Marin<sup>5,2</sup>, Alexis Gautreau<sup>6</sup> & Nathalie Sauvonnet<sup>1,2,§,\*</sup>

EMBO J. 2015 Aug 13;34(16):2147-61.

#### **IL-2R**:

- IL-2R = Récepteur à l'interleukine 2 à endocytose constitutive
- IL-2 : déclenche prolifération cellulaire lors réponse immunitaire
- internalisation par une voie indépendante de la clathrine suspectée mais jamais décrite en ME



M.Trichet@IBPS

# IL-2R à la base de protrusions cellulaires



## Reviewer #1:

In general I found the level of gold labeling very low. Given its importance to the manuscrit I would expect more than one gold particle in the various structure in the EM images provided and more quantification given the low levels of labeling.

# IL-2R à la base de protrusions cellulaires

#### Contrôle de spécificité anticorps secondaire :

|        | ProtA-Gold |          | Antibody + ProtA-Gold |          |
|--------|------------|----------|-----------------------|----------|
|        | Beads      | Sections | Beads                 | Sections |
| Нер2β  | 7          | 220      | 271                   | 243      |
| Kit225 | 0          | 40       | 127                   | 221      |
| total  | 7          | 260      | 398                   | 464      |

Basquin et coll., 2015

#### Reviewer #1:

In general I found the level of gold labeling very low. Given its importance to the manuscrit I would expect more than one gold particle in the various structure in the EM images provided and more quantification given the low levels of labeling.

IL-2R à la base de protrusions cellulaires



