



HAL
open science

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-02870140v1>

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.



HAL Authorization

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

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

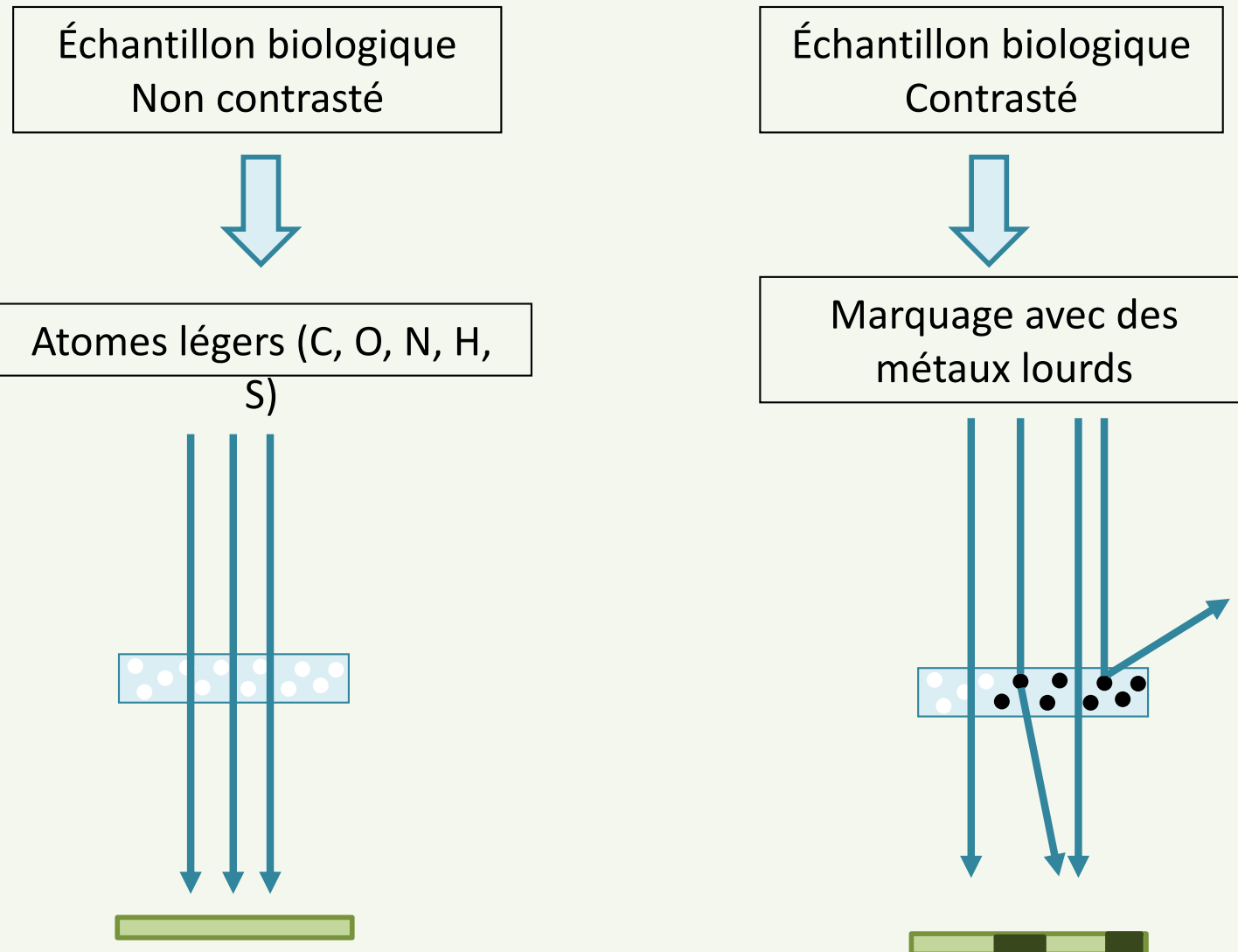
Jessica MARION
Imagerie-Gif
I2BC
Gif-sur-Yvette

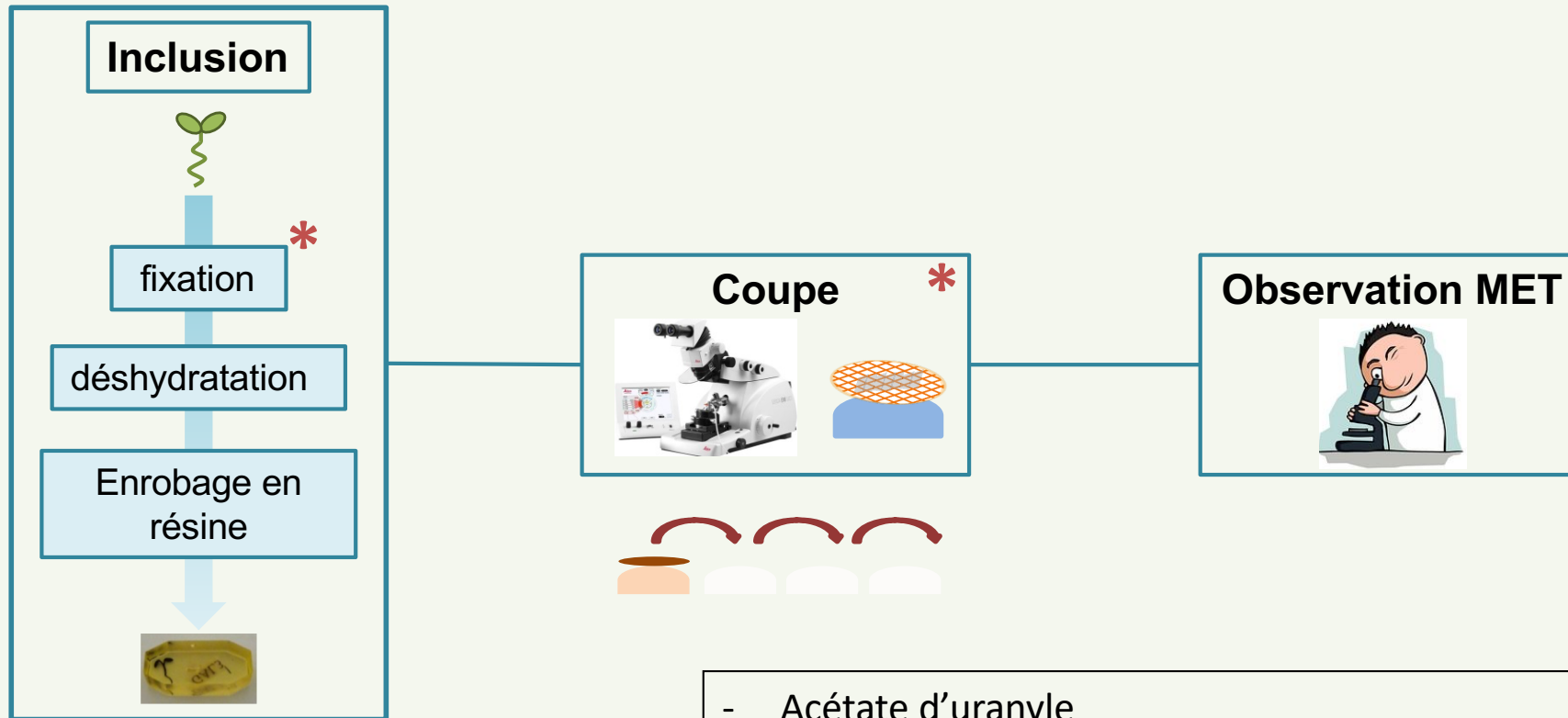


Michaël TRICHET
Service de Microscopie Electronique
Institut de Biologie Paris-Seine
Sorbonne-Université



La cytochimie





* **Contraste des coupes sur grille**

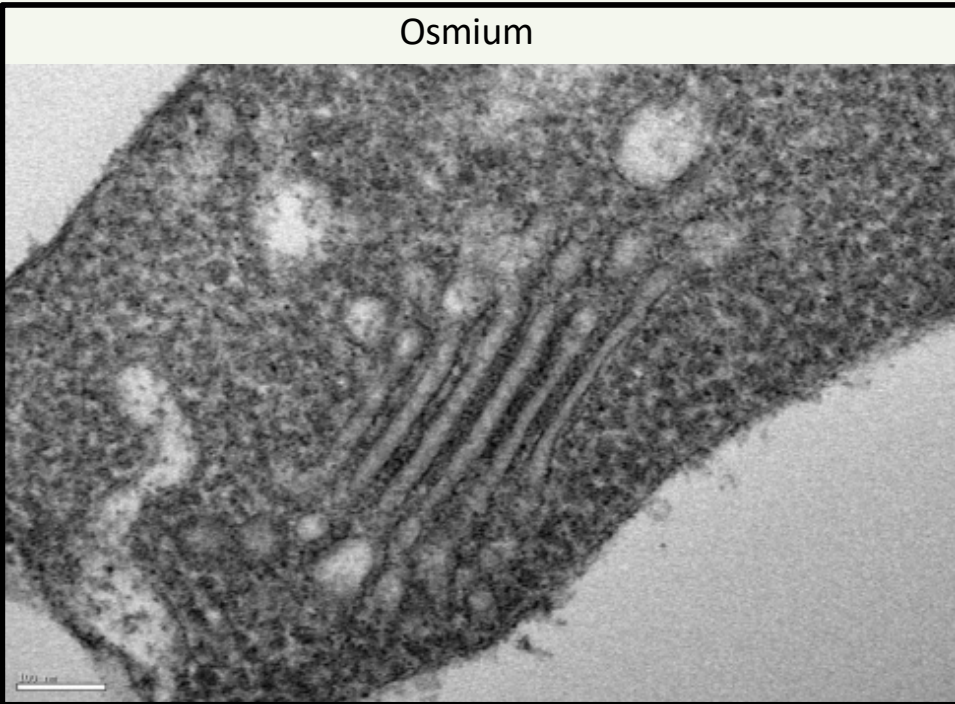
* **Post-fixation ou contraste en bloc**

- Acétate d'uranyle
- Citrate de plomb
- OTE (oolong tea extract)
- sels de lanthanides (gadolinium, lanthane et samarium)

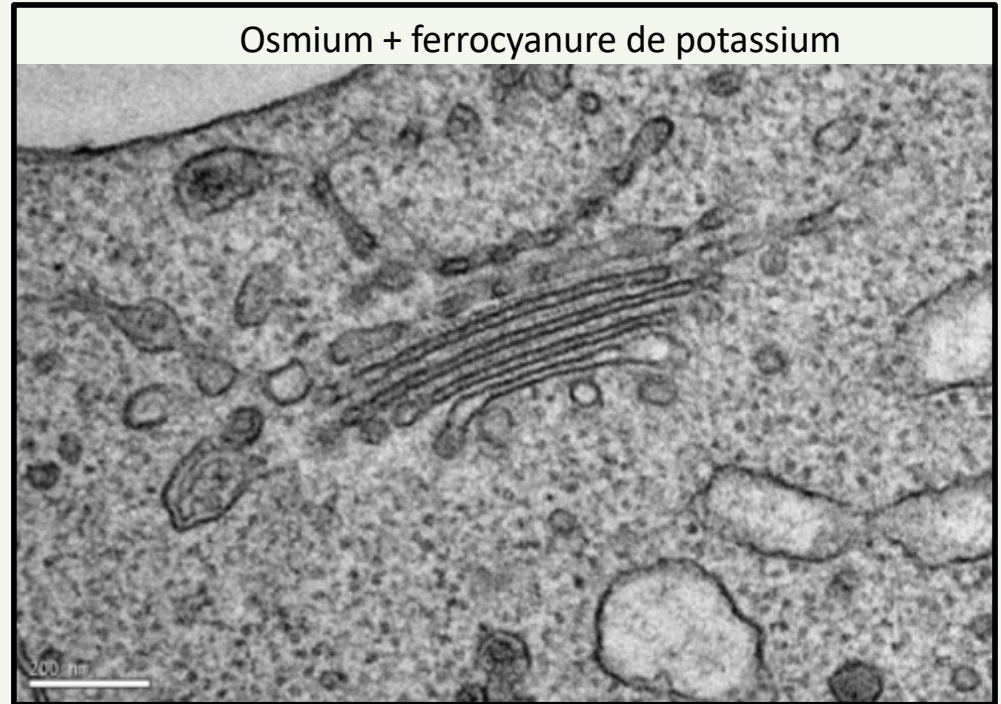
- Osmium
- Osmium + ferrocyanure de potassium
- Osmium + acide tannique
- Osmium + Zinc + iode
- Acétate d'uranyle

Augmente contraste des membranes

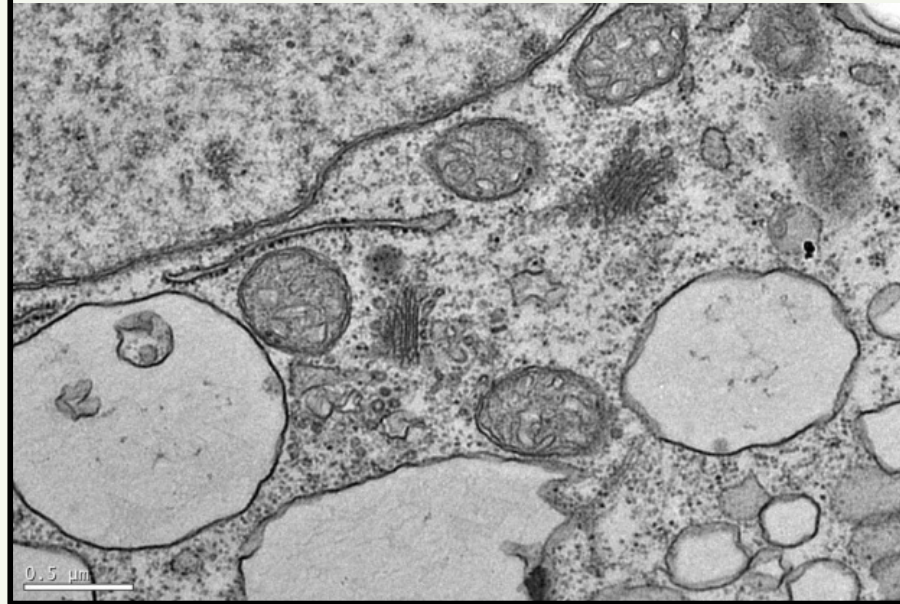
Osmium



Osmium + ferrocyanure de potassium

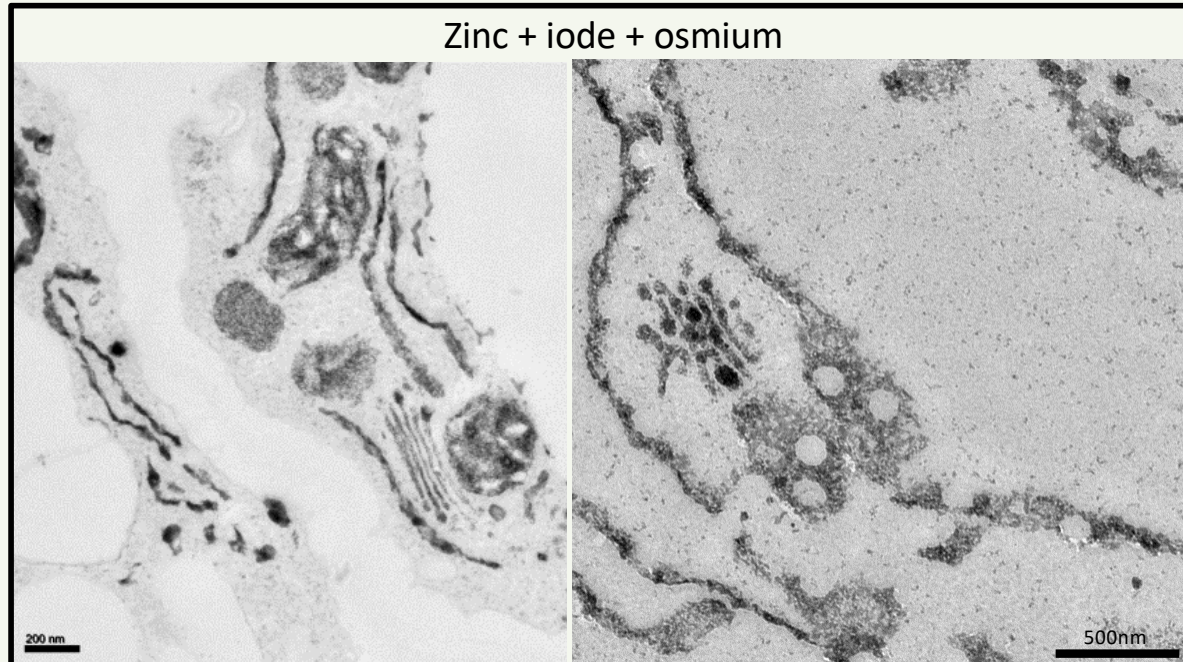


Osmium + ferrocyanure de potassium



Marquage
dense du RE

Zinc + iode + osmium

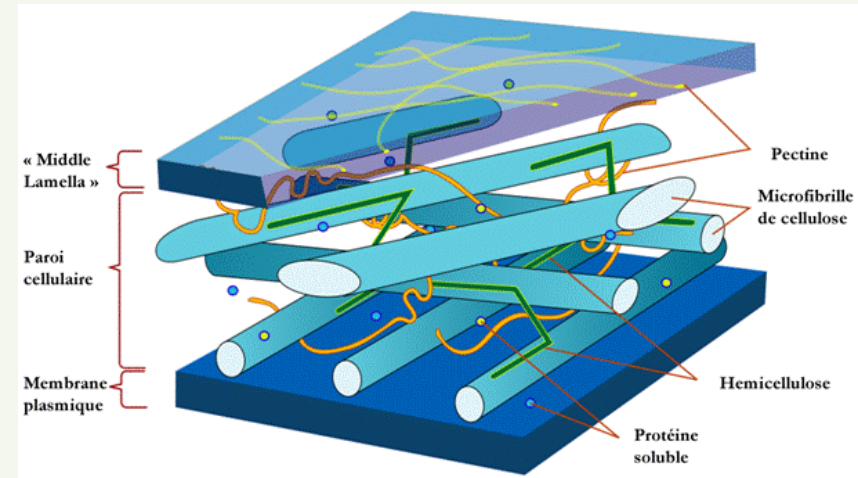


Mise en évidence de composés spécifiques

- Des polysaccharides complexes (pectine) → rouge de ruthénium
- Des glycoprotéines → acide phosphotungstique
- Des polysaccharides → test du PaTag
- D'enzymes: ex. peroxydase, phosphatase...

.....

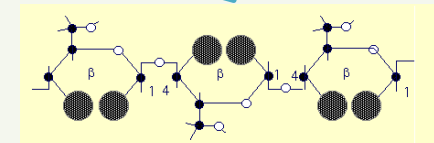
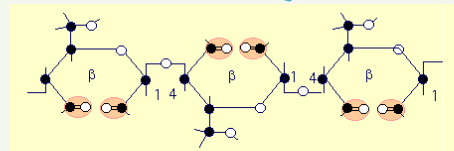
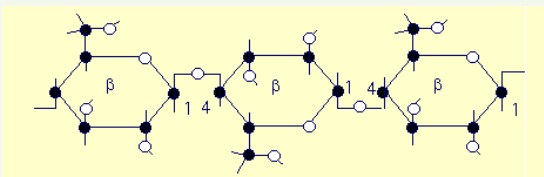
- Test du PATAg
 Periodic Acid- Thiocarbohydrazide-Argent proteinate
 Exemple : la paroi végétale



Acide périodique

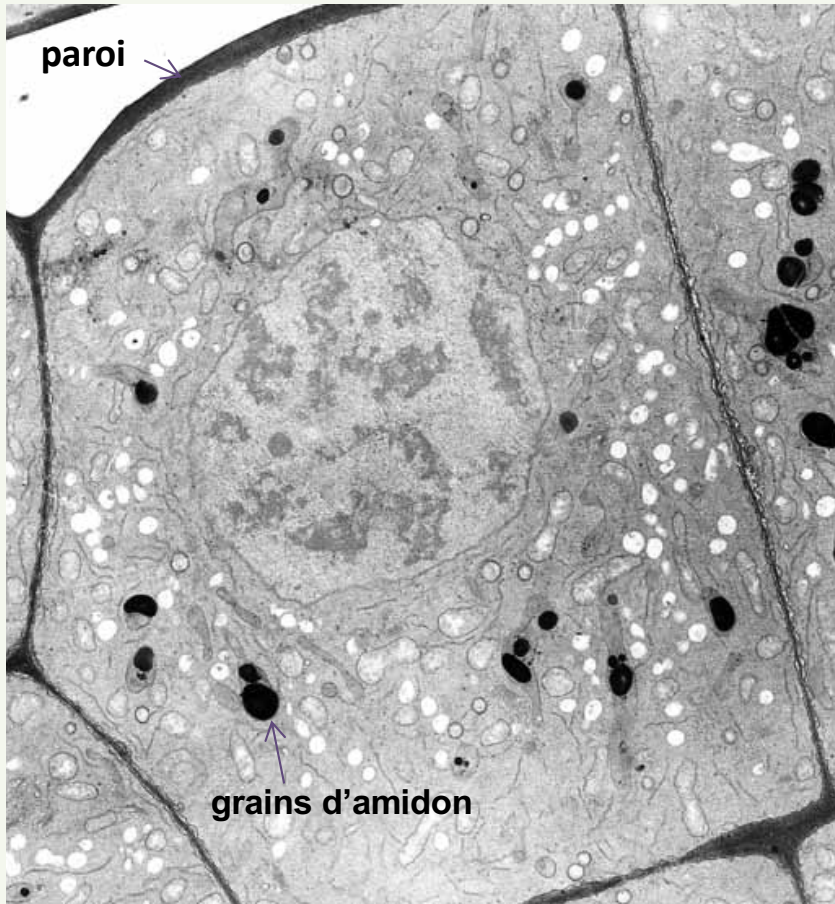
Thiocarbohydrazide et protéinate d'argent

La cellulose

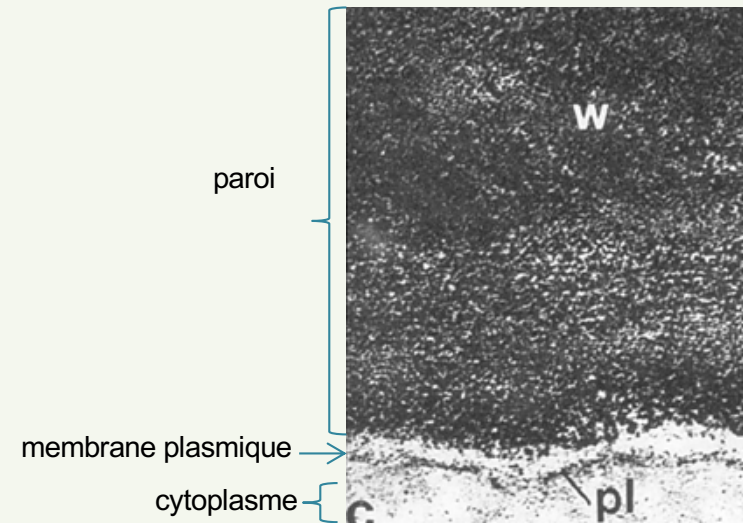


- Test du PATAg

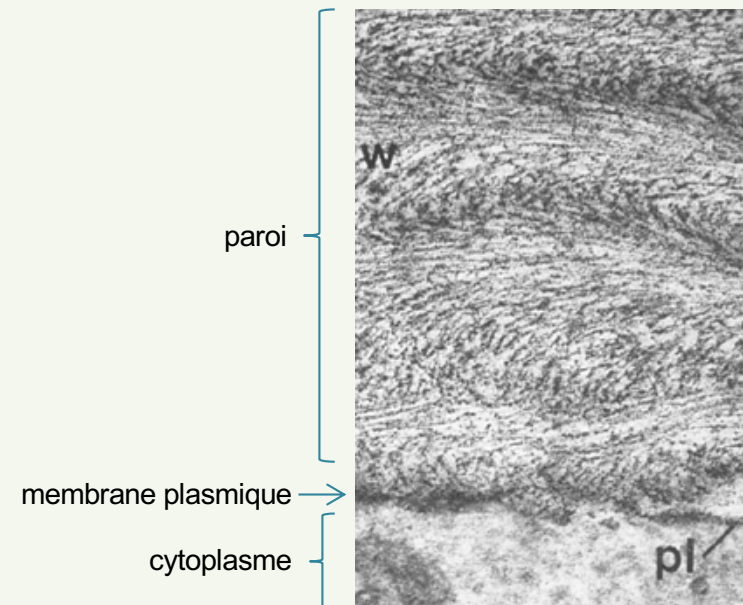
Cellule de racine



Zoom de la paroi



↓ Digestion enzymatique partielle des hémicellulose/pectine

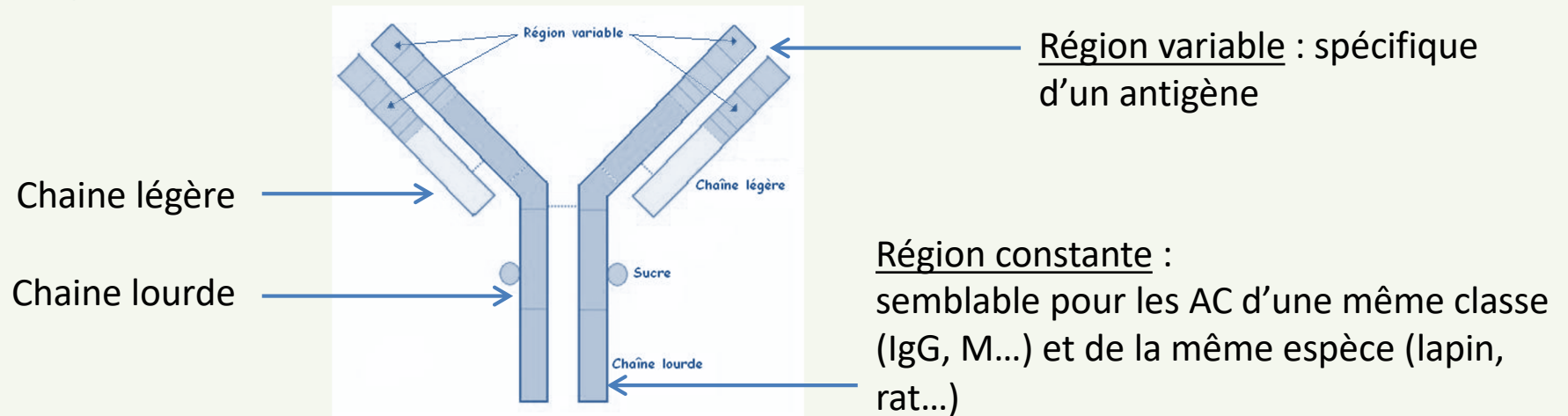


L'immunomarquage

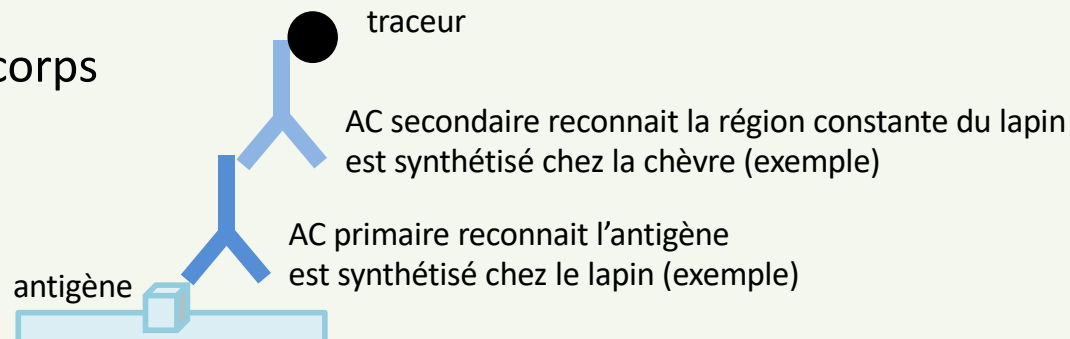
Le principe

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



↳ Utilisation de 2 anticorps

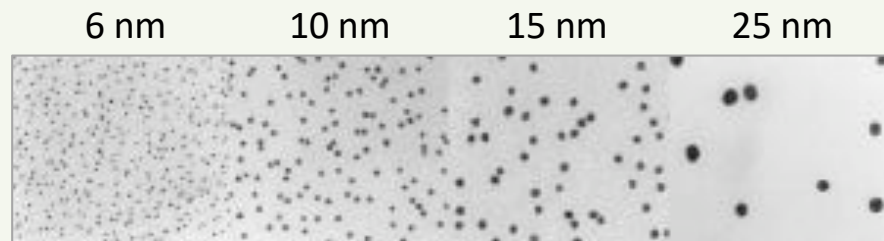


Les traceurs

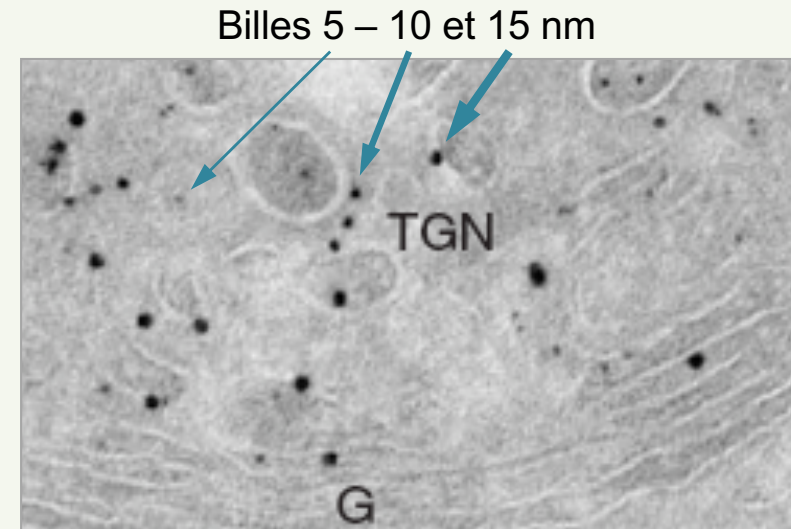
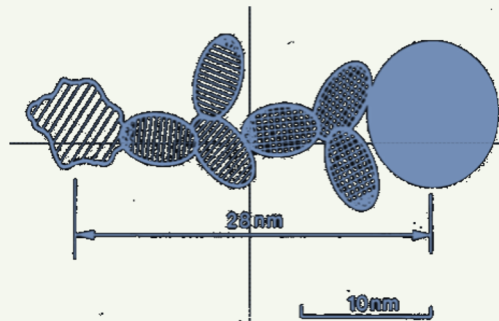
élément couplé à l'AC IIaire et permettant de le détecter au MET

• Bille d'or colloïdal :

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

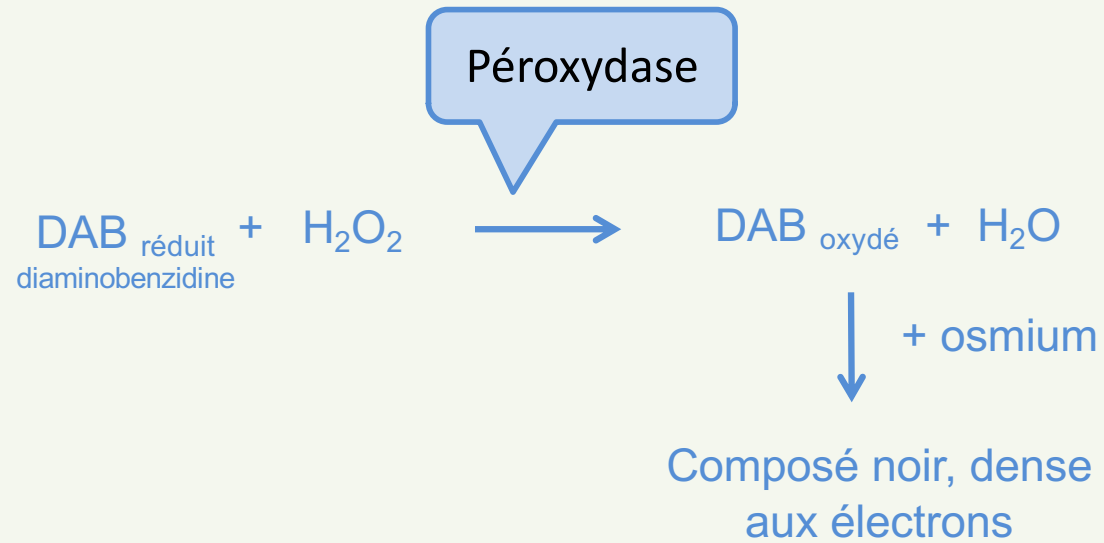


Aurion

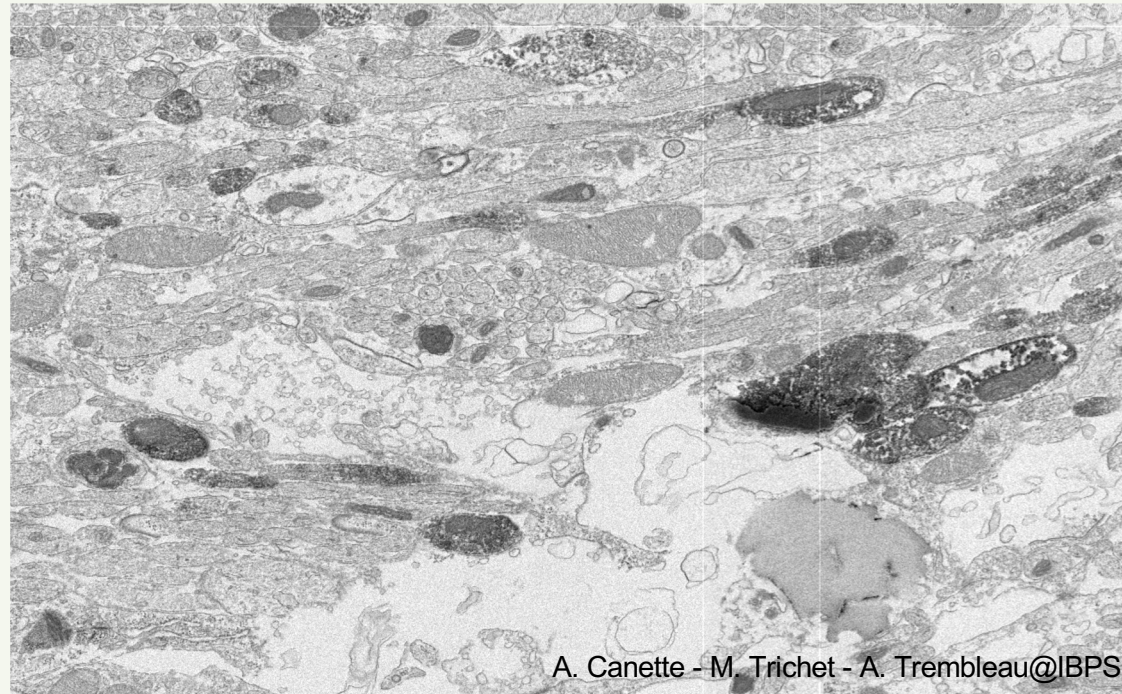


Cellule hépatocyte humaine.
G: Golgi, TGN: Trans Golgi Network
Slot & Geuze, 2007

- Enzyme :



Ac anti-récepteur olfactif
Bulbe olfactif murin



A. Canette - M. Trichet - A. Trembleau@IBPS

Les différentes étapes

Limitation
du bruit de
fond

PBS-Glycine 100mM	Blocage des groupements aldéhydiques du fixateur
PBS-BSA 1 %	Blocage des sites non spécifiques
Anticorps primaire	
PBS PBS-BSA	lavages
Anticorps secondaire	
PBS H ₂ O	lavages

Immunomarquage nécessite :

Une préparation d'échantillons adaptée

- **Accessibilité** aux antigènes
- **Préservation** antigénicité et ultrastructure

Fixation

Paraformaldéhyde

- Fixation faible des protéines
- **Préserve l'antigénicité**

0 - 1,5 %
4 %

Ultrastructure

Immunocytochimie

Glutaraldéhyde

- Fixation forte des protéines
- **Altère l'antigénicité**

1 - 2,5 %
0,1 %

Cryofixation - cryosubstitution

- Fixation ≈ instantanée
- ⚠ artefacts fixation/déshydrat° /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

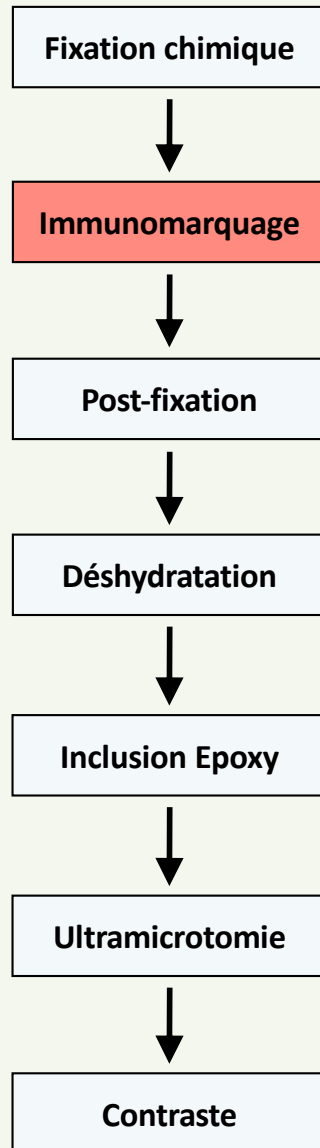
- Inerte
- **Préserve l'ultrastructure**
- **Masquage antigènes**

Acrylique

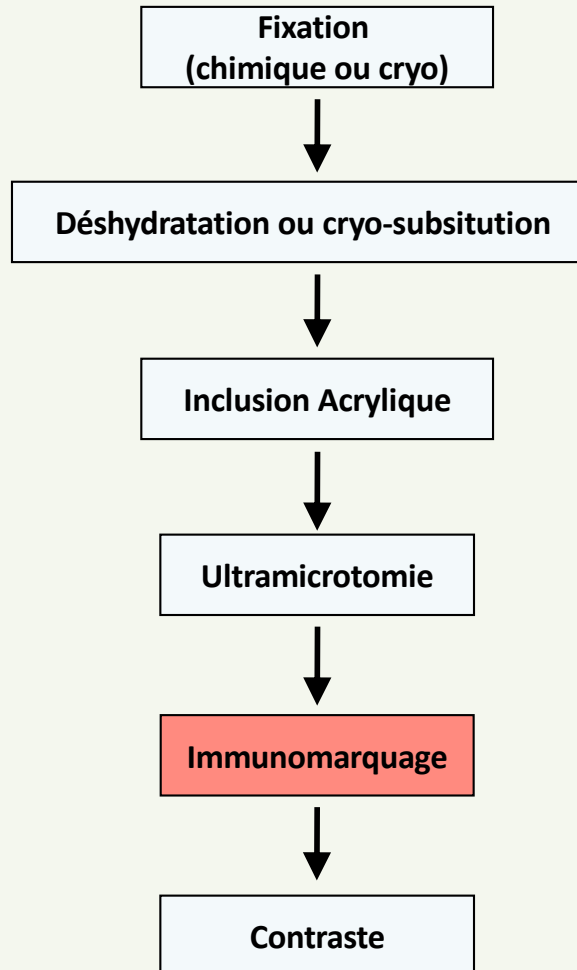
- Extraction
- **Préserve l'antigénicité**
- **Altère l'ultrastructure**

Inclusion à basse température

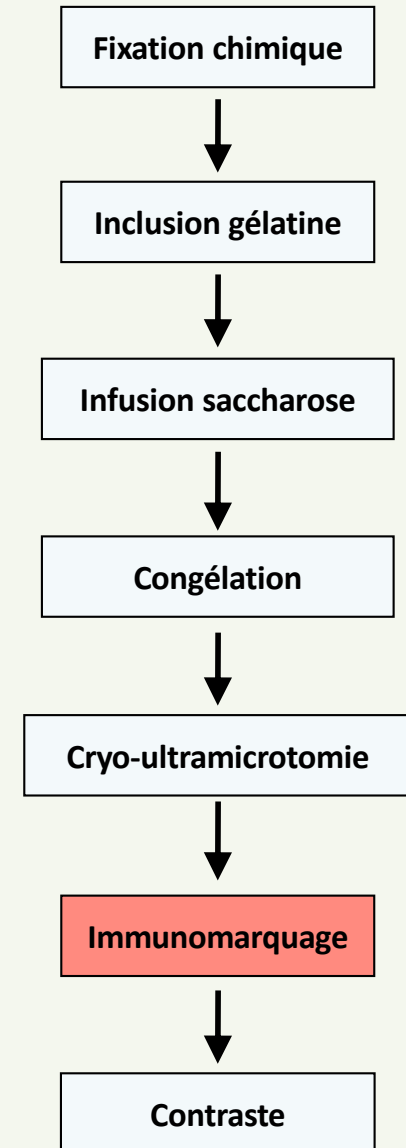
(A) Pre-inclusion



(B) Post-inclusion



(C) Tokuyasu

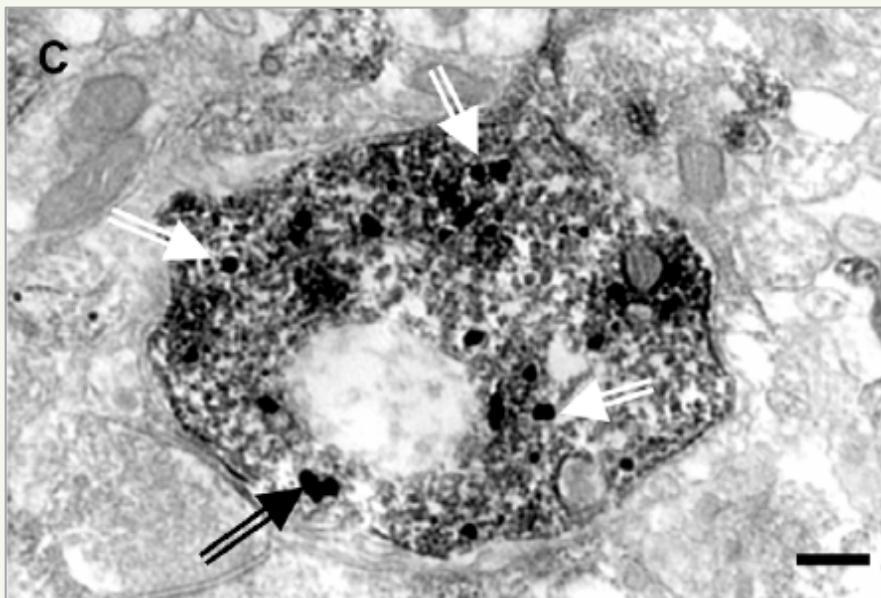
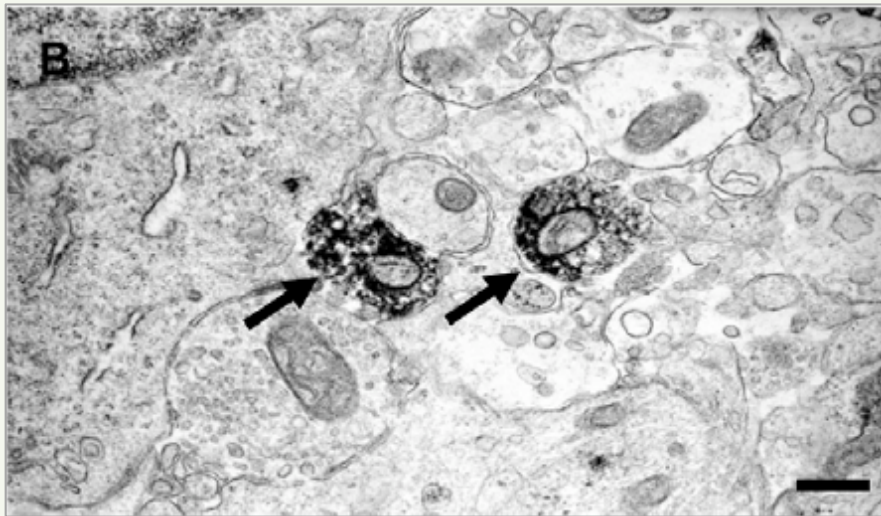


(A) Pre-inclusion

Coupe de cerveau de rat

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

Egginger et coll., 2011



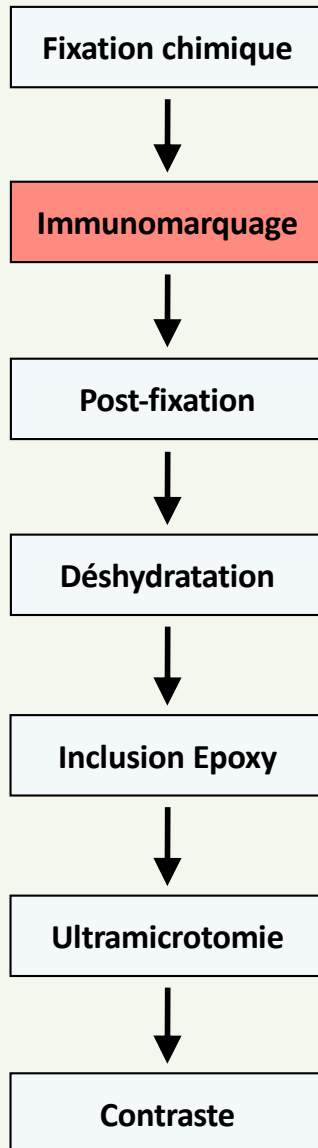
Points (+) du pre-embedding :

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

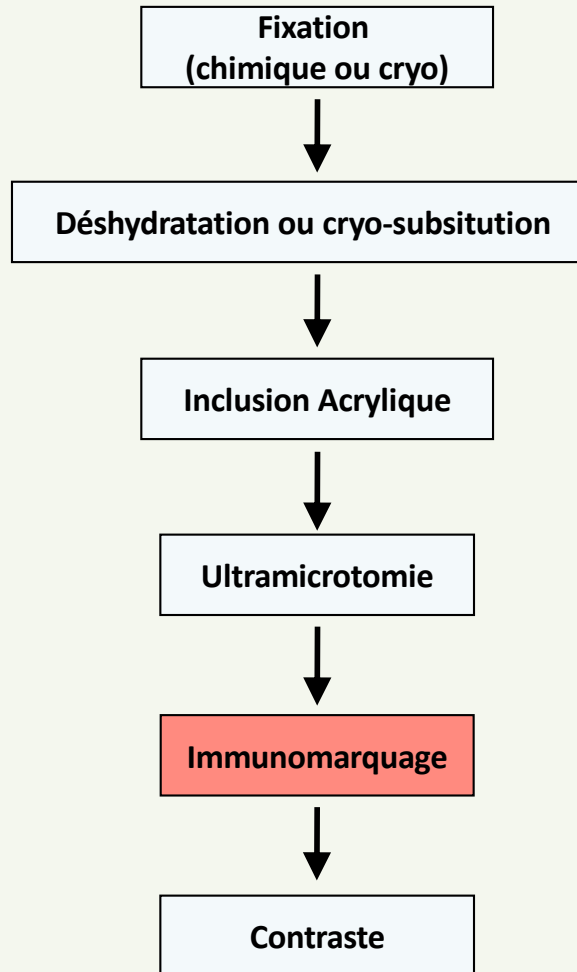
Points (-) du pre-embedding :

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

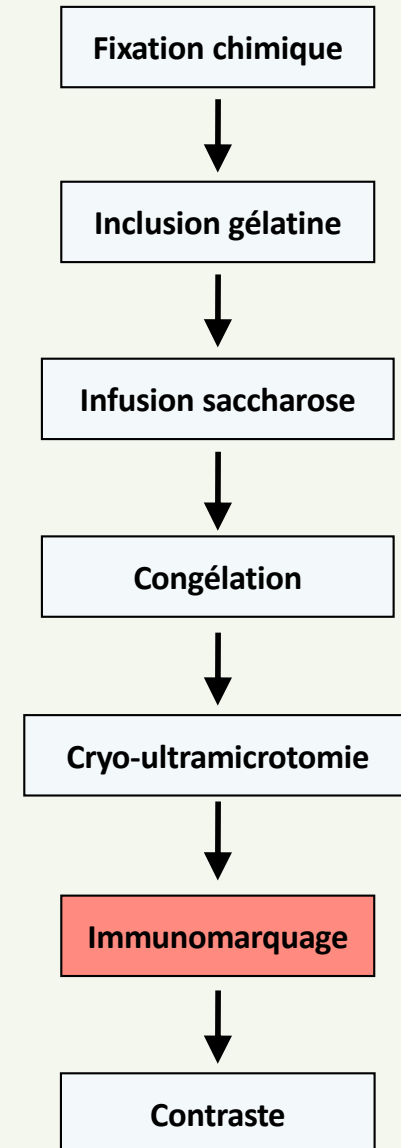
(A) Pre-inclusion



(B) Post-inclusion



(C) Tokuyasu

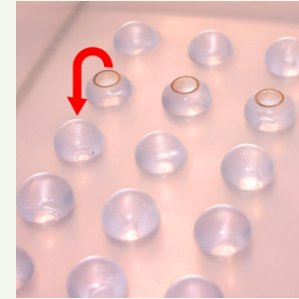
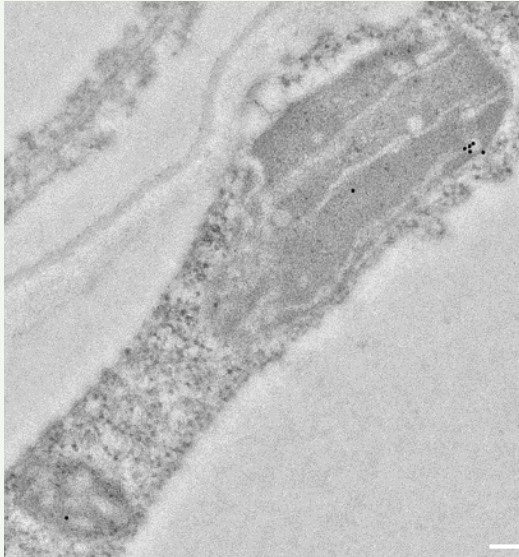


(B) Post-inclusion

Racine d'*A.thaliana*

AC DGDG (galactolipide)- marquage plaste et mitochondrie

J. Marion



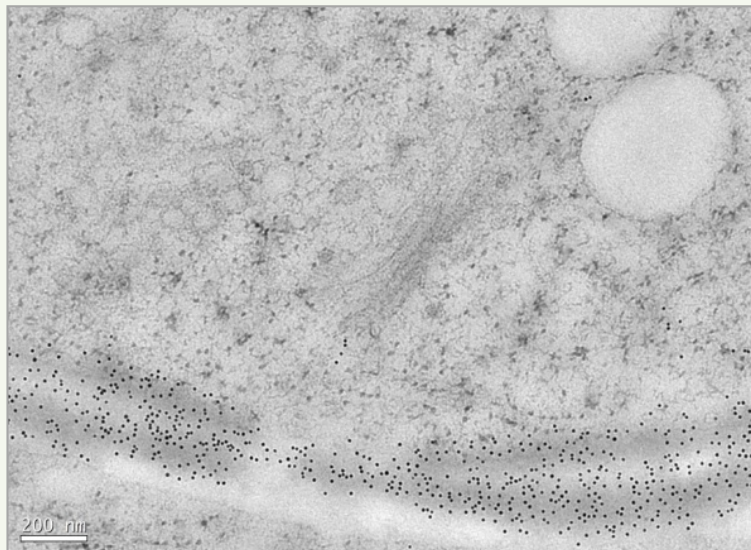
Points (+) du post-embedding :

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

Grain de blé, cellule de la couche à aleurone

AC anti glucane - marquage paroi et golgi

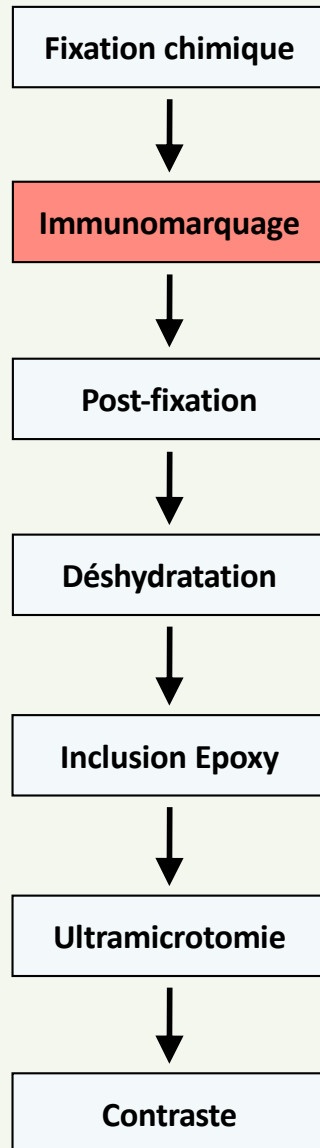
J. Marion



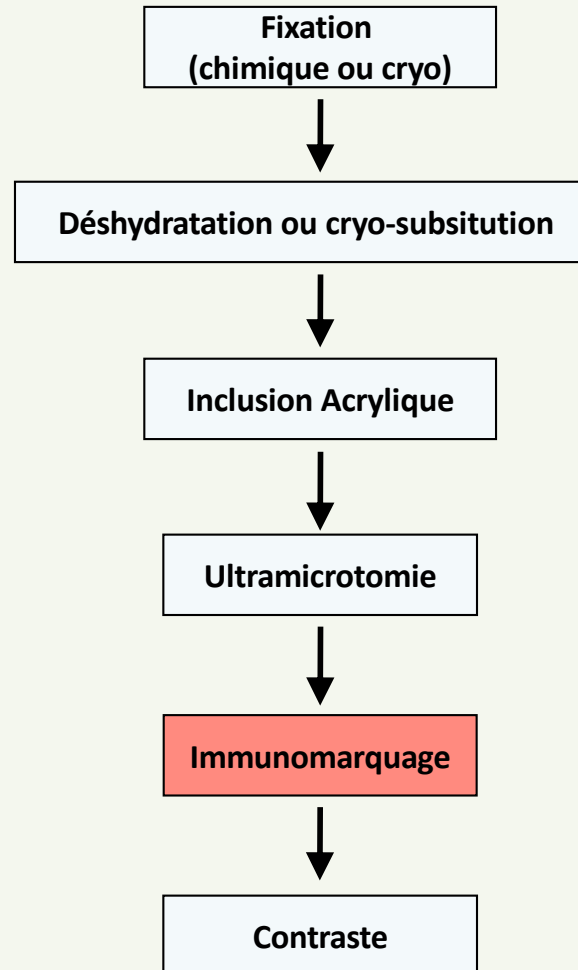
Points (-) du post-embedding :

- (Fixation aldéhydrique faible)
- \emptyset osmium : extraction et contraste faible des membranes
- Résines acryliques : extraction constituants
- Restreint aux antigènes abondants

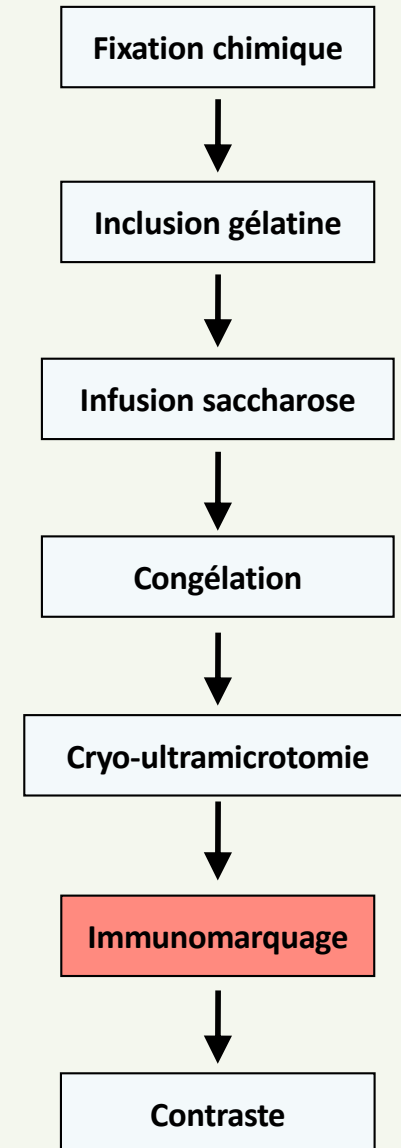
(A) Pre-inclusion



(B) Post-inclusion



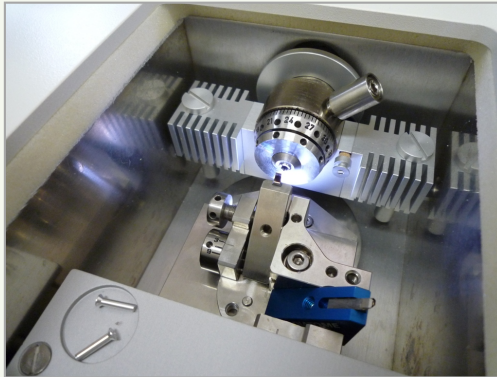
(C) Tokuyasu



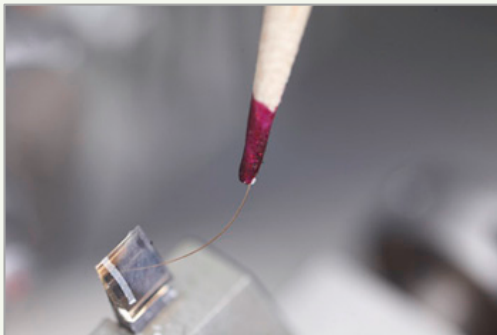
(C) Méthode de Tokuyasu

Principe du Tokuyasu :

Durcir échantillon par le froid après cryoprotection



Chambre cryo-
ultramicrotome

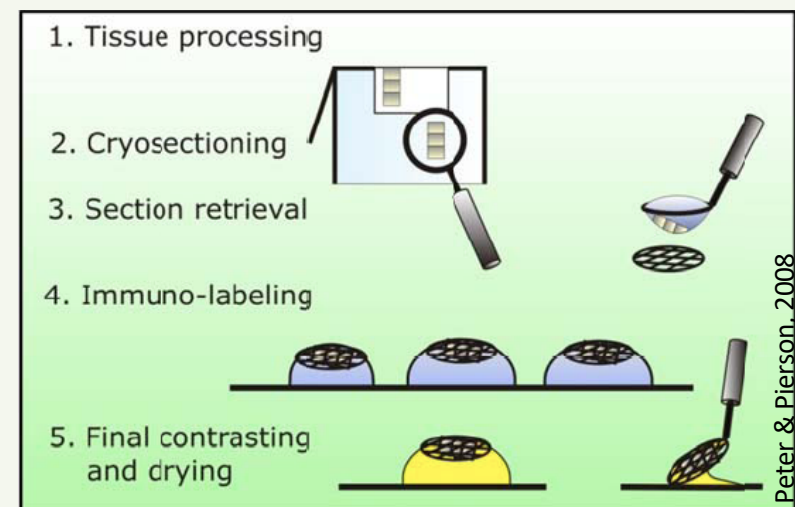
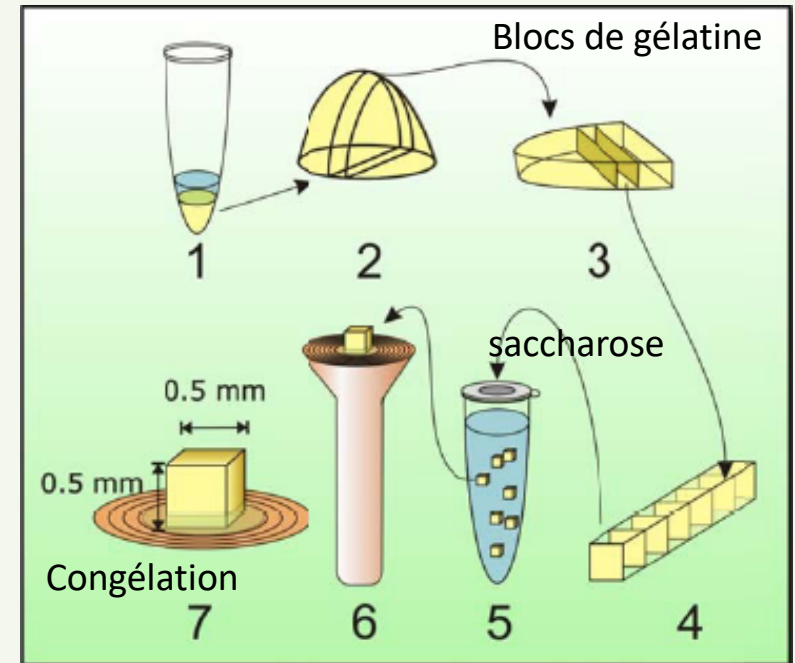


Cryo-section
(-120° C)



Récupération des
coupes

Préparation échantillon :

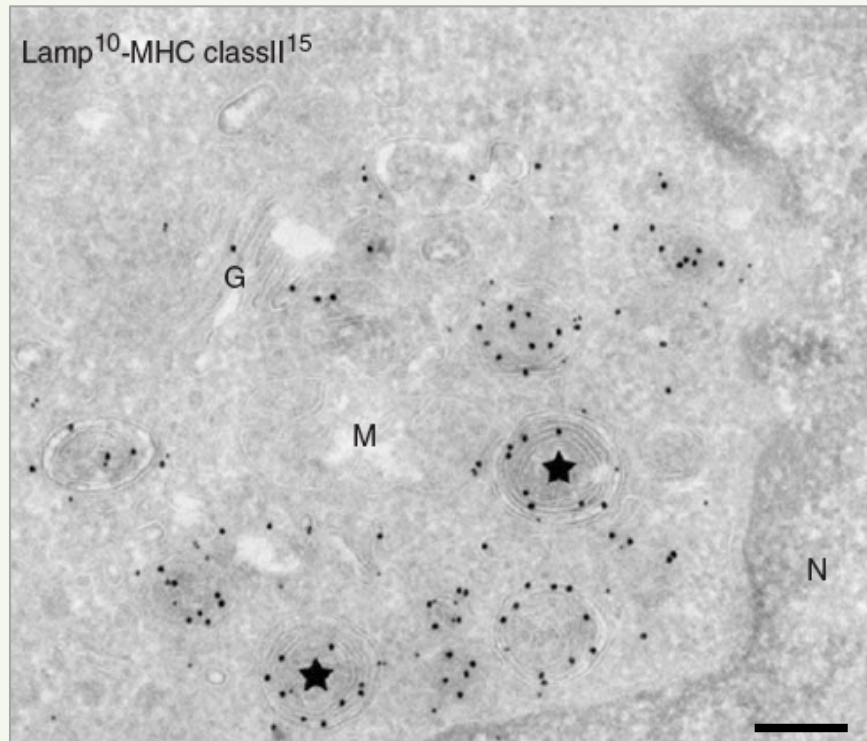


Peter & Pierson, 2008

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

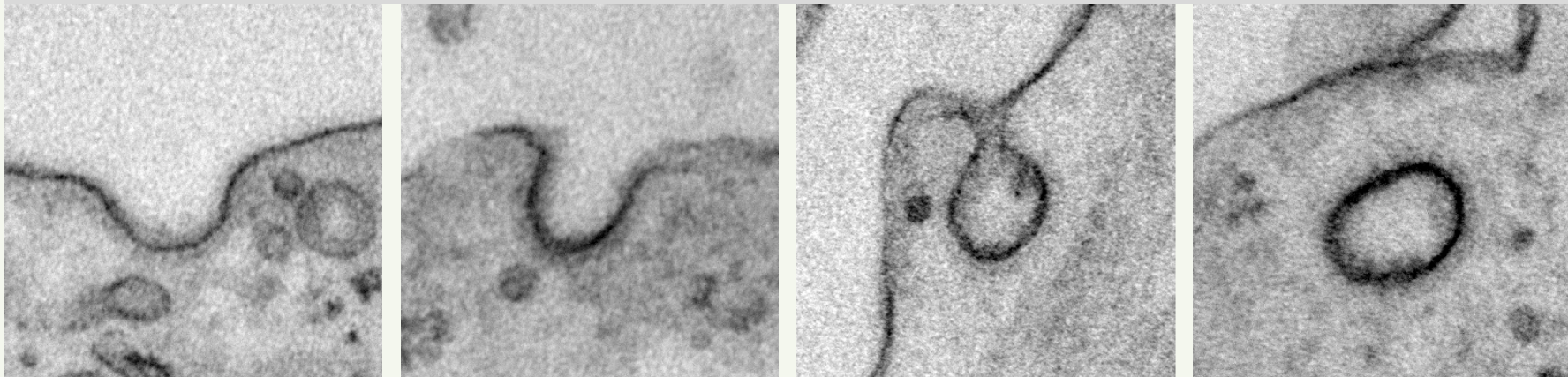
Cyril Basquin^{1,2,‡}, Michaël Trichet^{3,†}, Helena Vihinen^{4,†}, Valérie Malardé^{1,2,§,†}, Thibault Lagache^{5,2,†}, Léa Ripoll^{1,2,¶}, Eija Jokitalo⁴, Jean-Christophe Olivo-Marin^{5,2}, Alexis Gautreau⁶ & Nathalie Sauvonnet^{1,2,§,*}

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

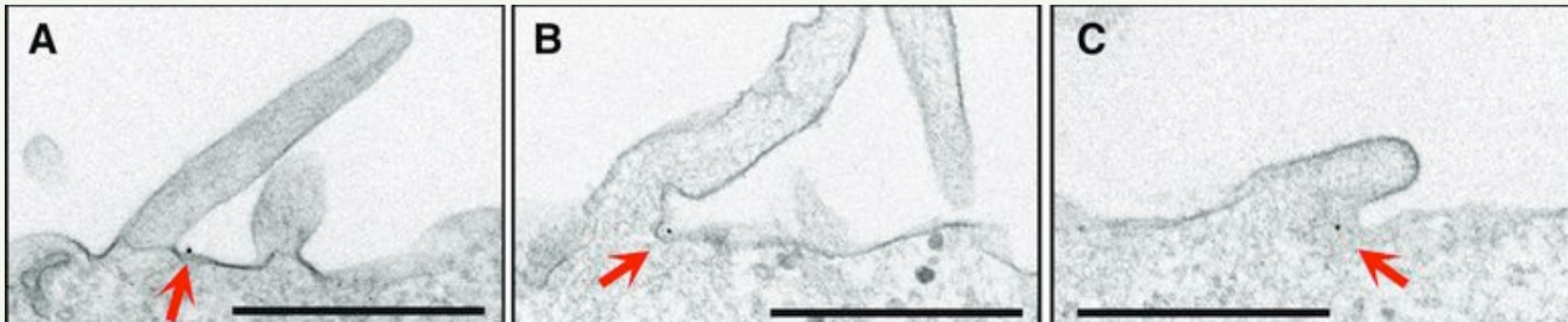
IL-2R :

- 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

MET



IL-2R à la base de protrusions cellulaires



Basquin et coll., 2015

Reviewer #1:

In general I found the level of gold labeling very low. Given its importance to the manuscript 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
Hep2 β	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 manuscript 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

