



**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.

# 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

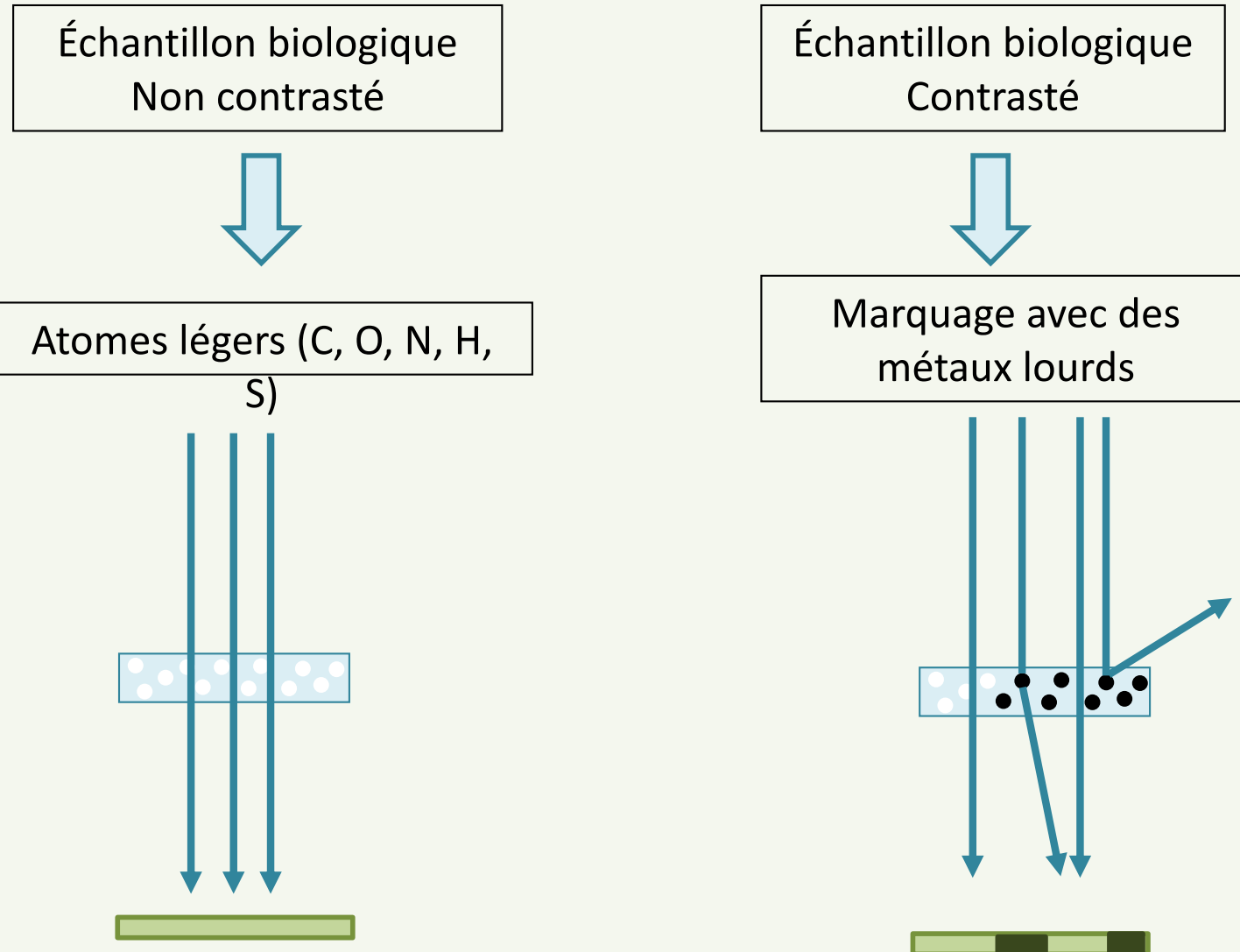


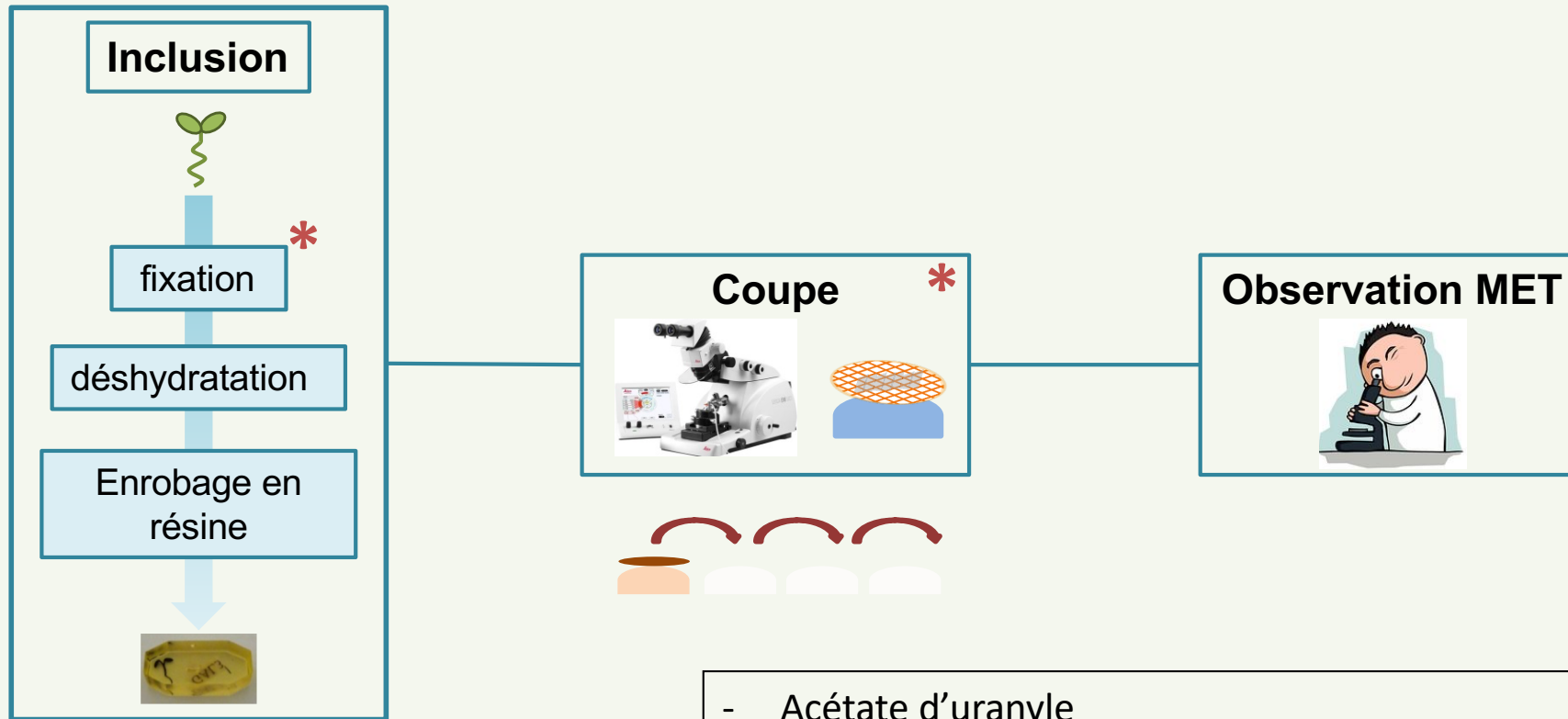
**Michaël TRICHET**

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



# La cytochimie





\* **Contraste des coupes sur grille**

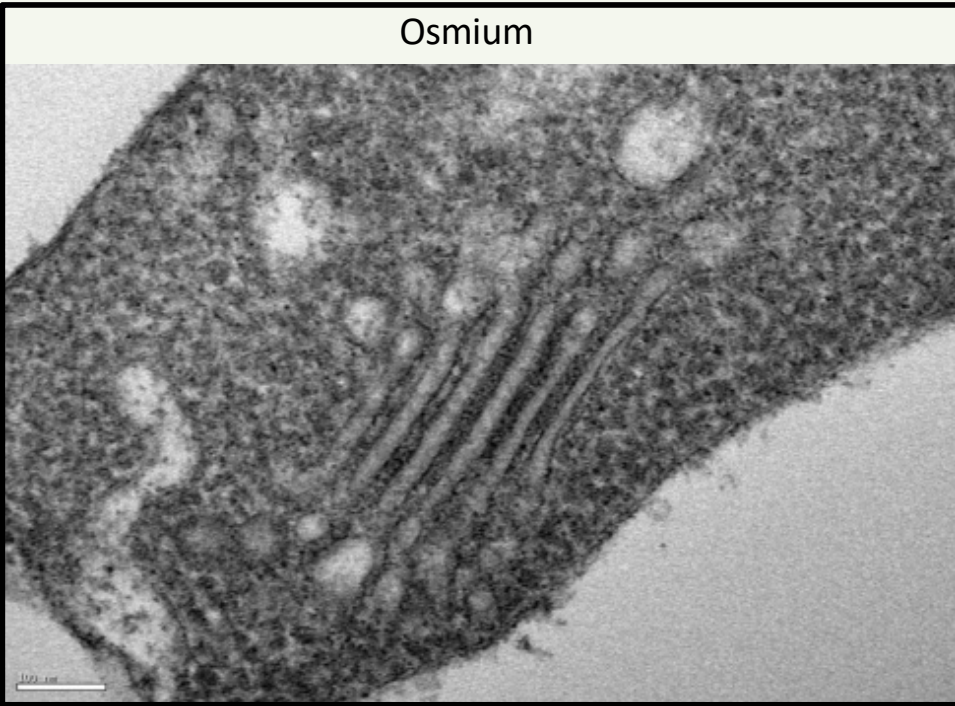
\* **Post-fixation ou contraste en bloc**

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

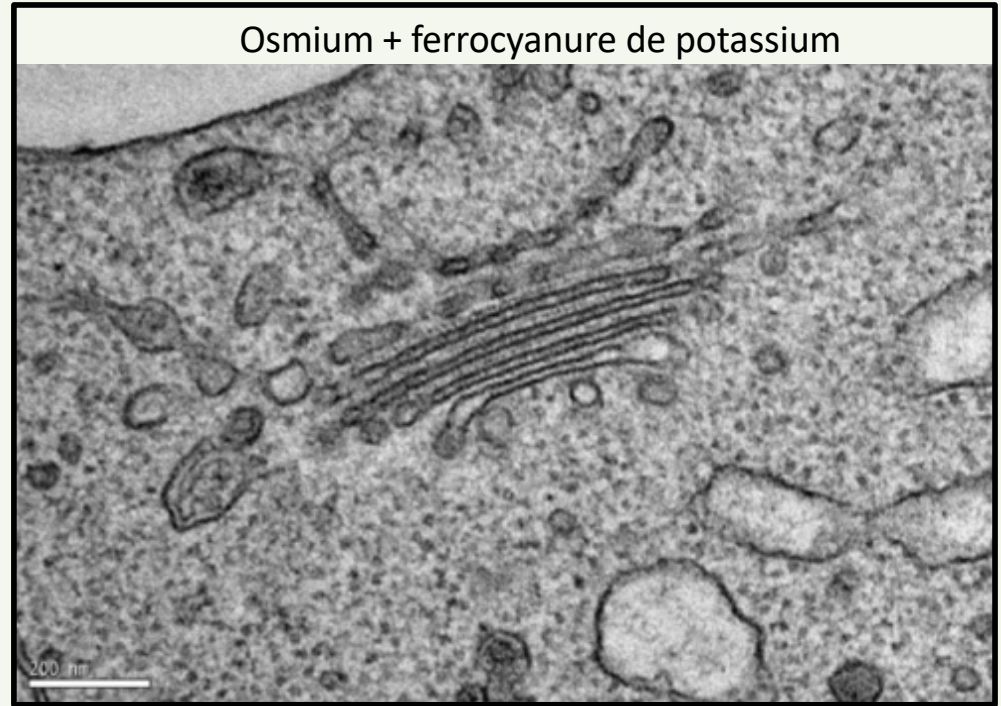
- Osmium
- Osmium + ferrocyanure de potassium
- Osmium + acide tannique
- Osmium + Zinc + iode
- Acétate d'uranyle

Augmente contraste des membranes

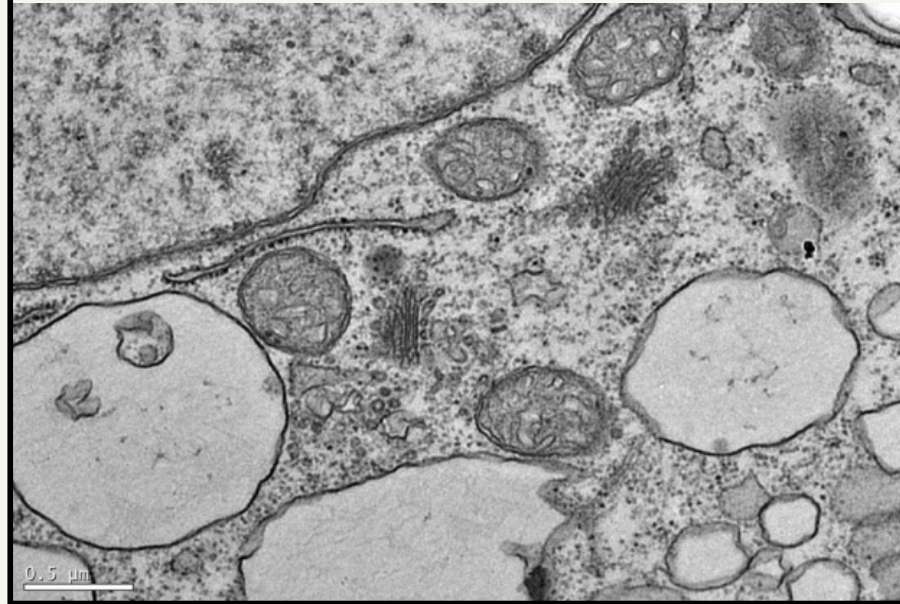
Osmium



Osmium + ferrocyanure de potassium

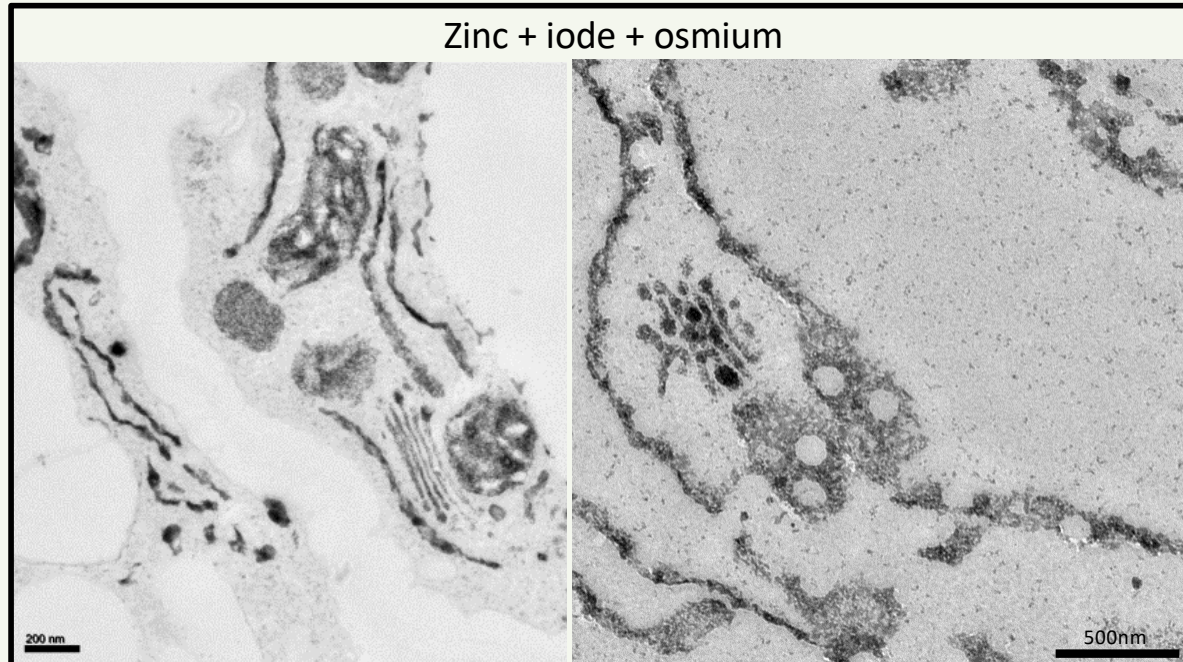


Osmium + ferrocyanure de potassium



Marquage  
dense du RE

Zinc + iode + osmium

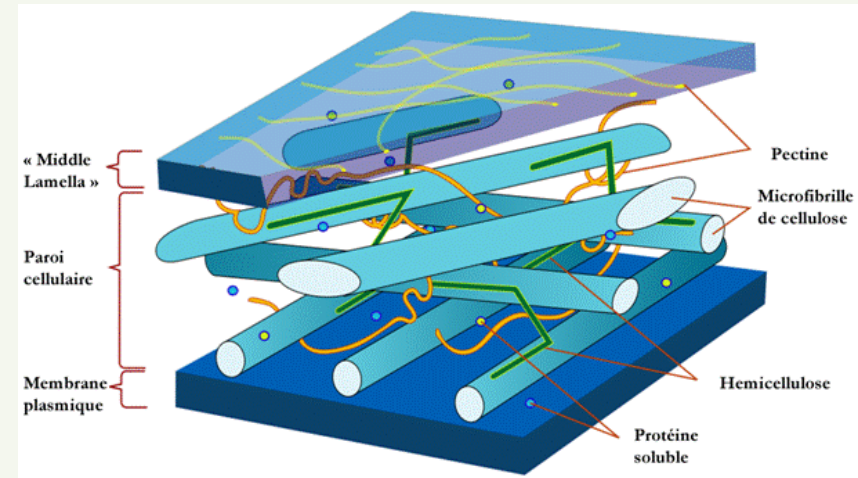


# Mise en évidence de composés spécifiques

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

.....

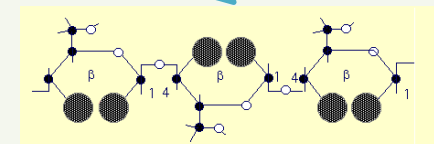
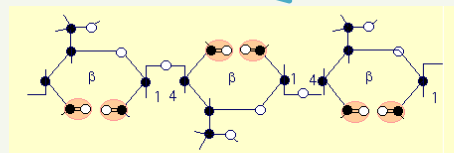
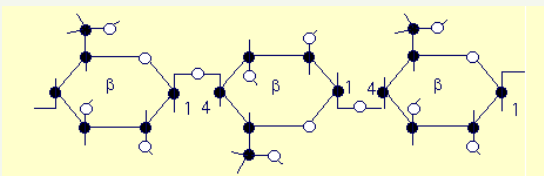
- Test du PATAg  
 Periodic Acid- Thiocarbohydrazide-Argent proteinate  
 Exemple : la paroi végétale



Acide périodique

Thiocarbohydrazide et protéinate d'argent

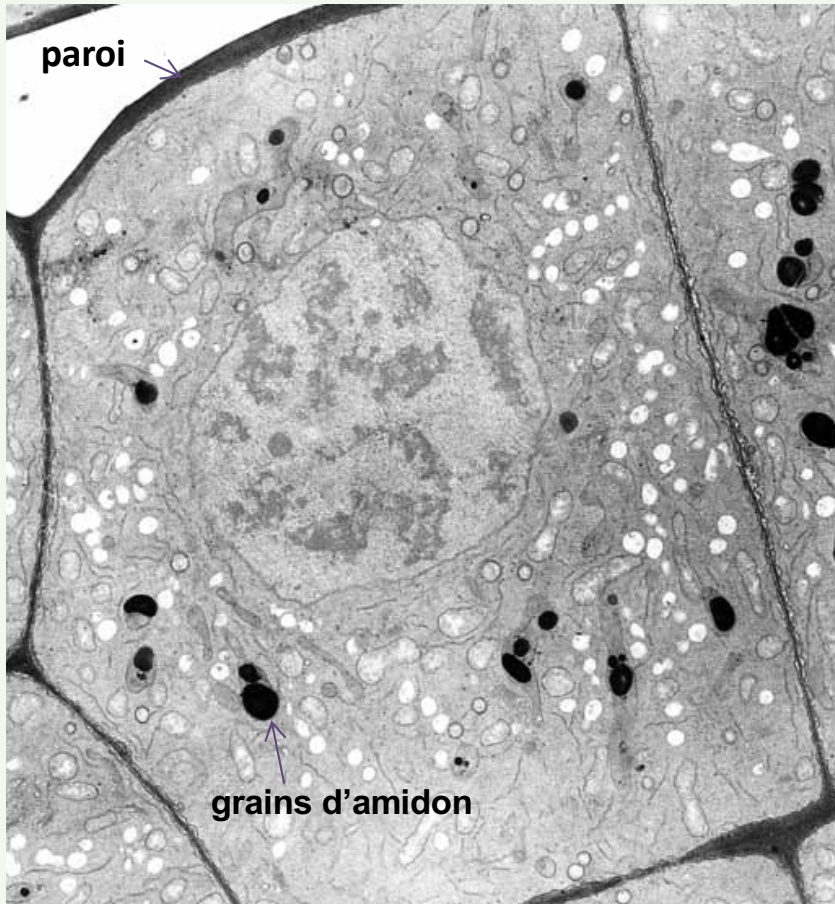
## La cellulose



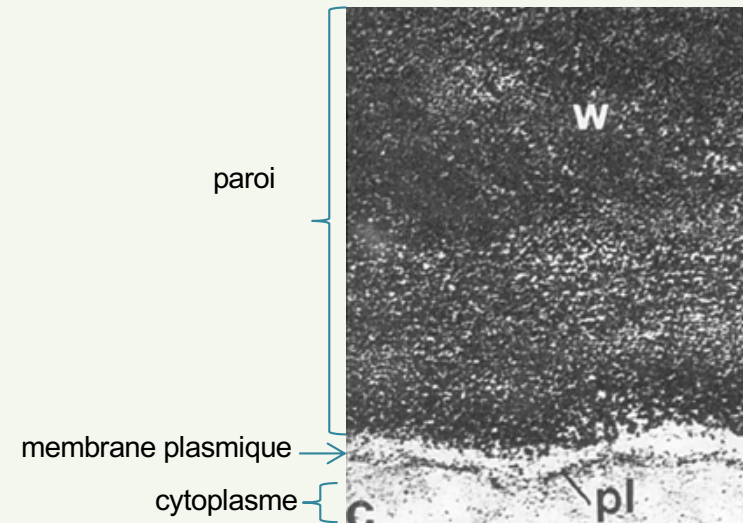


- Test du PATAg

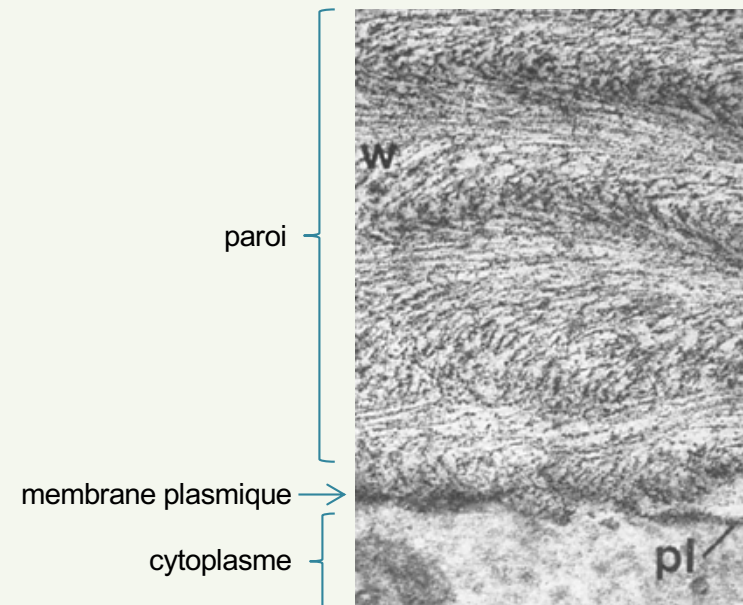
## Cellule de racine



## Zoom de la paroi



↓ Digestion enzymatique partielle des hémicellulose/pectine

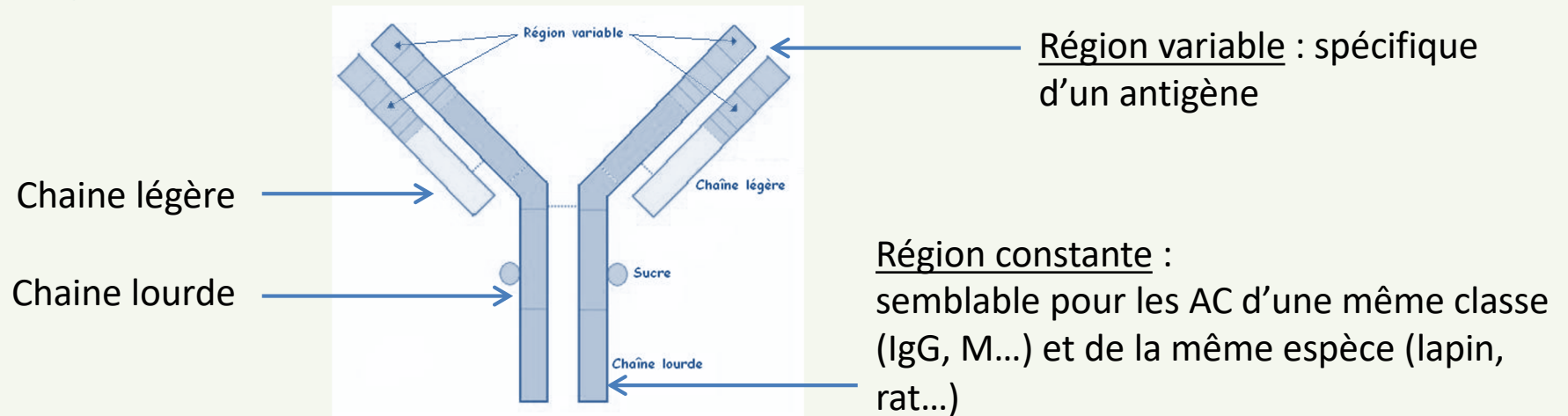


# L'immunomarquage

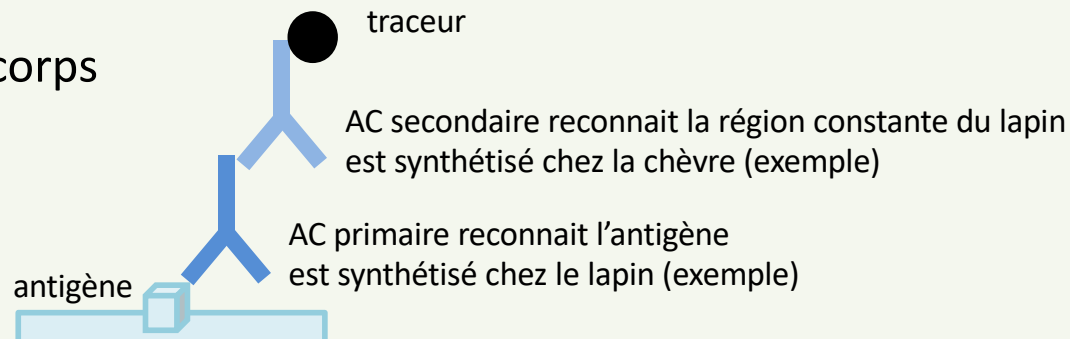
## Le principe

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

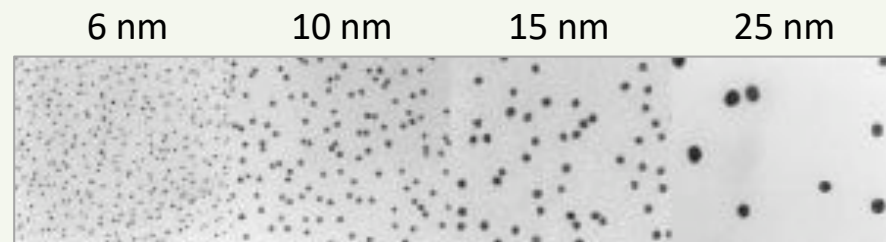


## Les traceurs

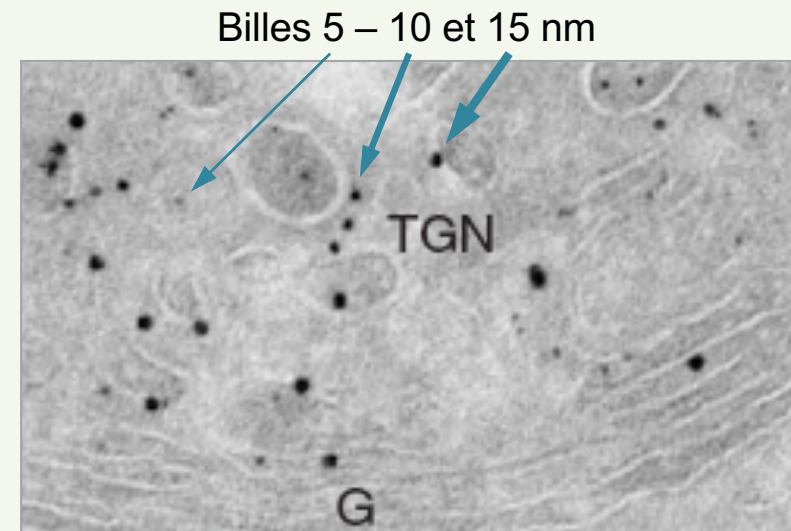
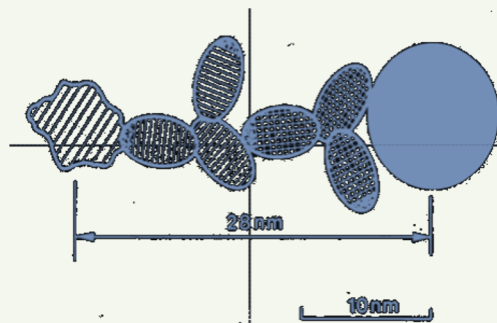
élément couplé à l'AC IIaire et permettant de le détecter au MET

### • Bille d'or colloïdal :

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

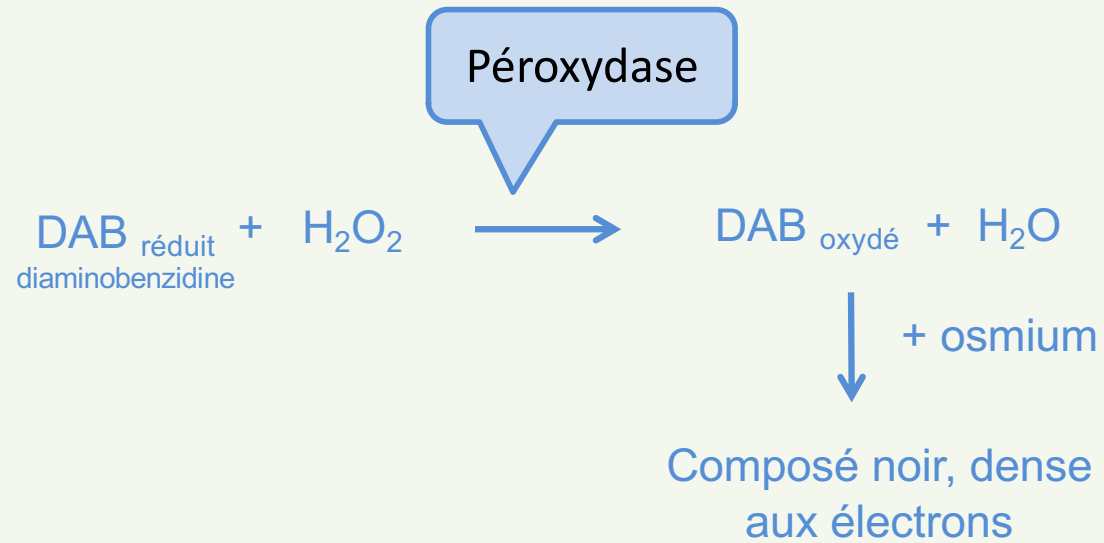


Aurion

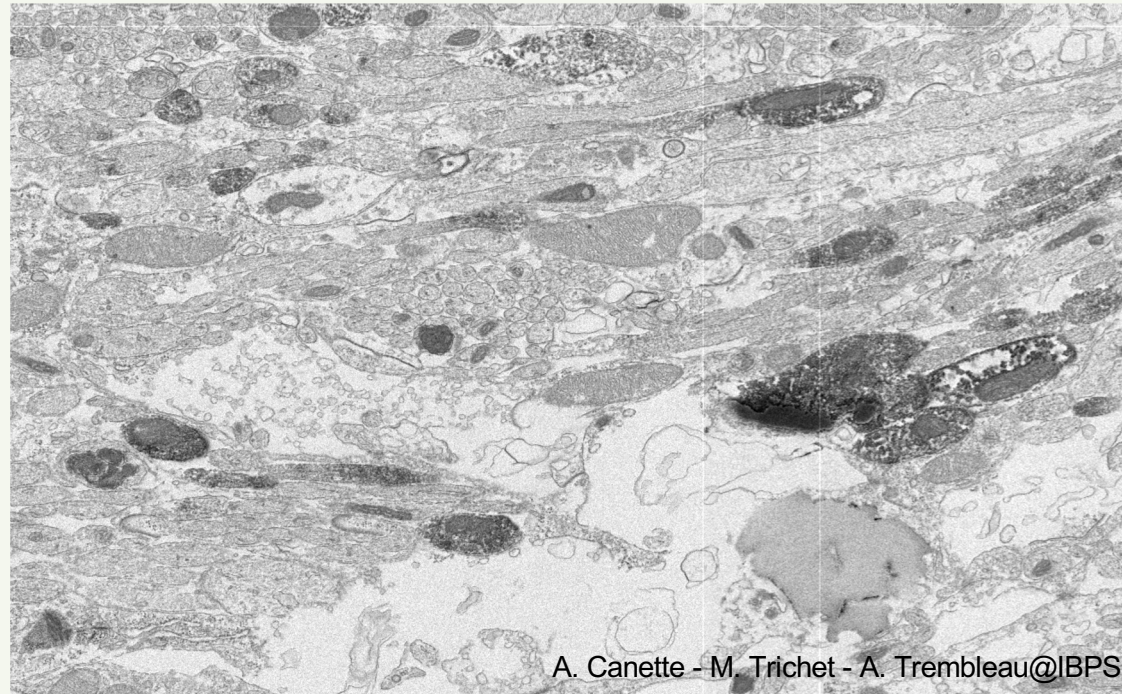


Cellule hépatocyte humaine.  
G: Golgi, TGN: Trans Golgi Network  
Slot & Geuze, 2007

- 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
<b>Anticorps primaire</b>	
PBS PBS-BSA	lavages
<b>Anticorps secondaire</b>	
PBS H <sub>2</sub> 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

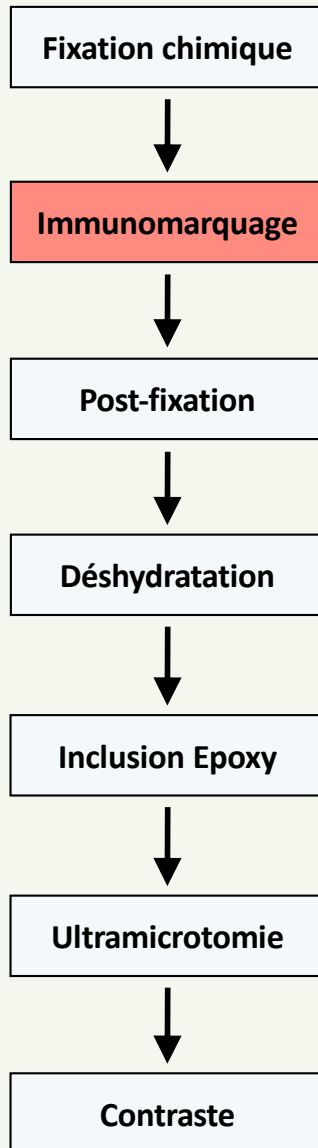
- Inerte
- **Préserve l'ultrastructure**
- **Masquage antigènes**

#### Acrylique

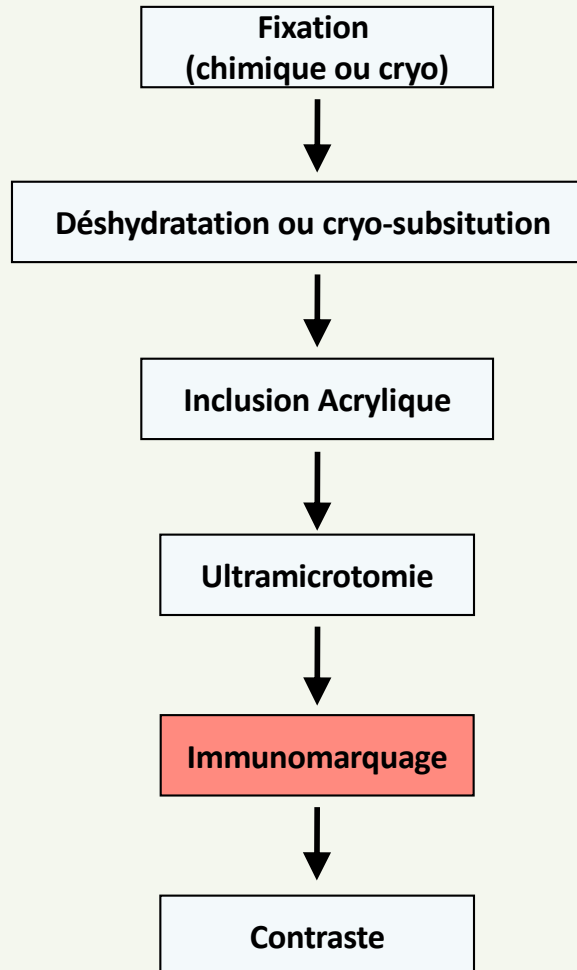
- Extraction
- **Préserve l'antigénicité**
- **Altère l'ultrastructure**

*Inclusion à basse température*

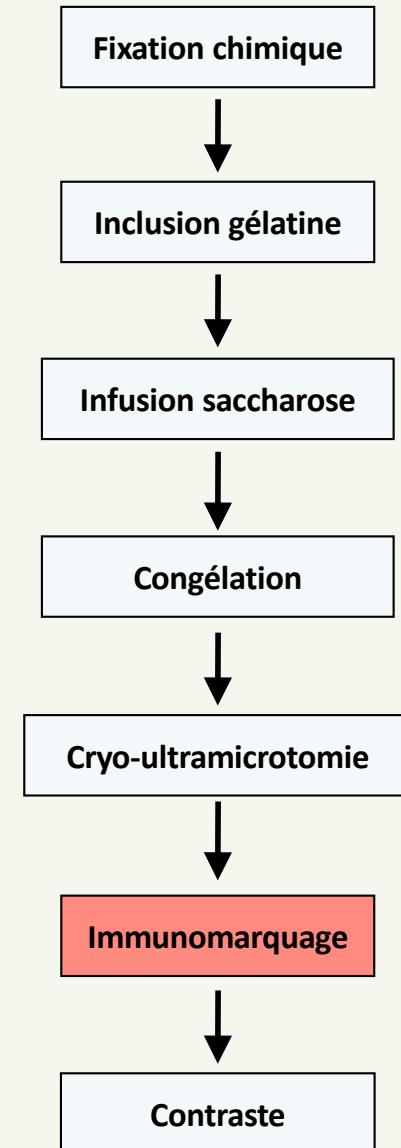
## (A) Pre-inclusion



## (B) Post-inclusion



## (C) Tokuyasu



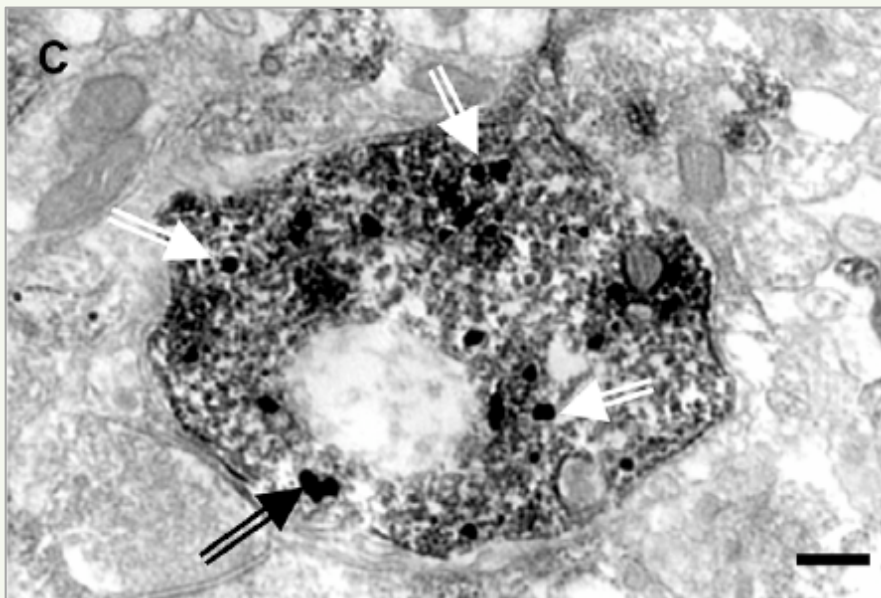
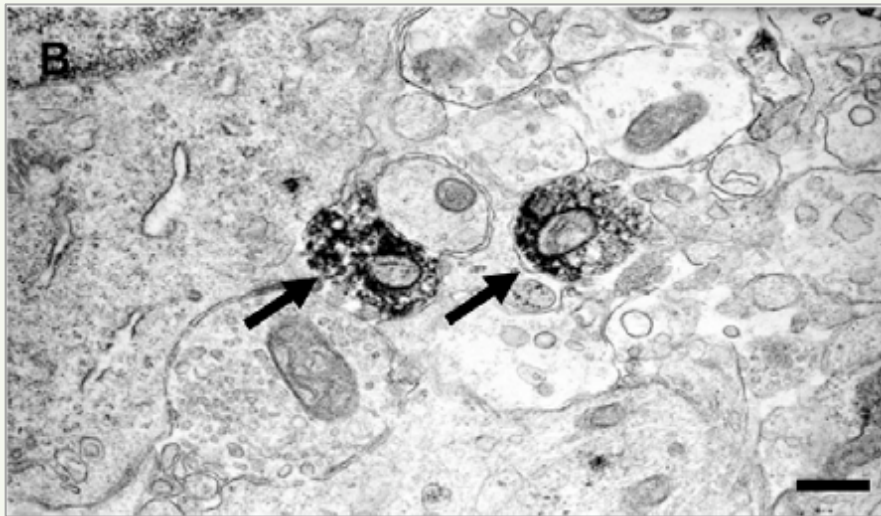


# (A) Pre-inclusion

## Coupe de cerveau de rat

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

*Egginger et coll., 2011*



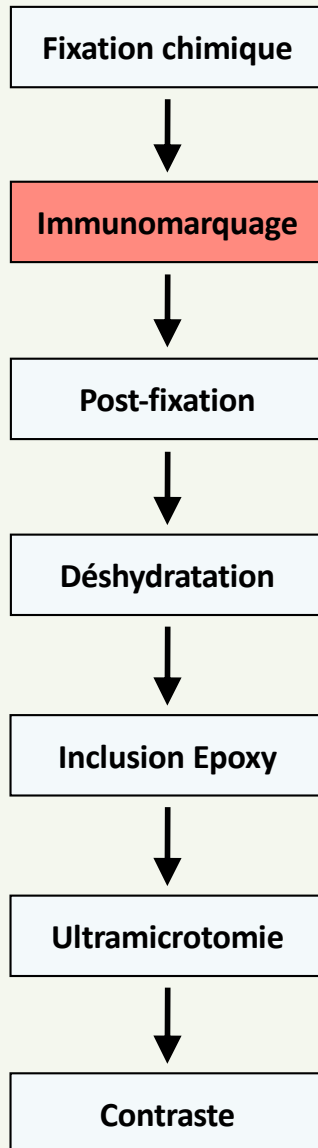
### Points (+) du pre-embedding :

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

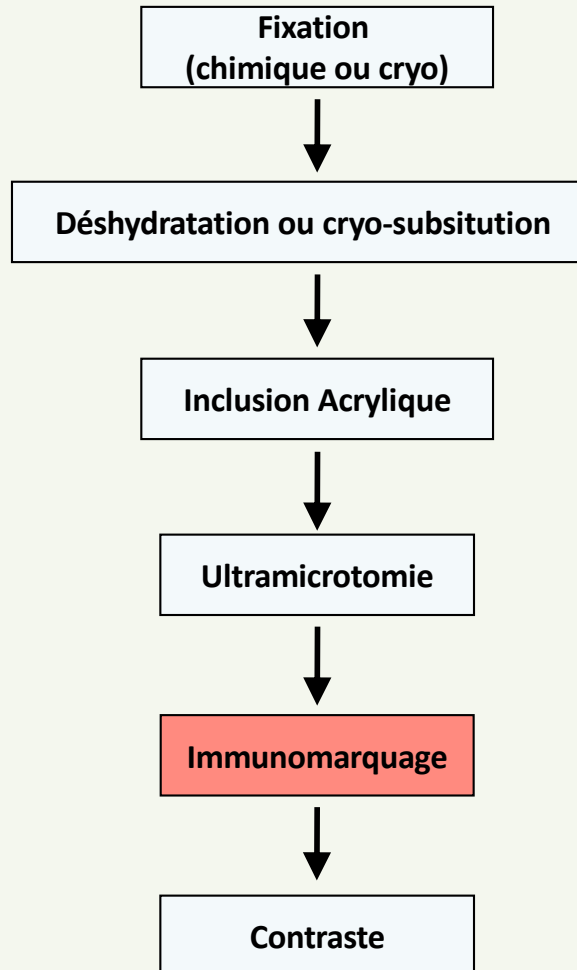
### Points (-) du pre-embedding :

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

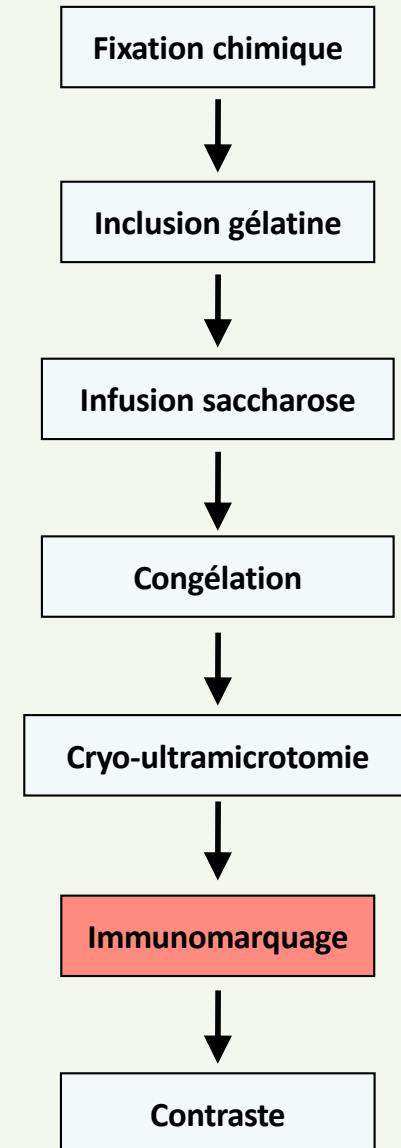
## (A) Pre-inclusion



## (B) Post-inclusion



## (C) Tokuyasu

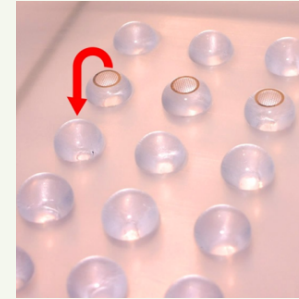
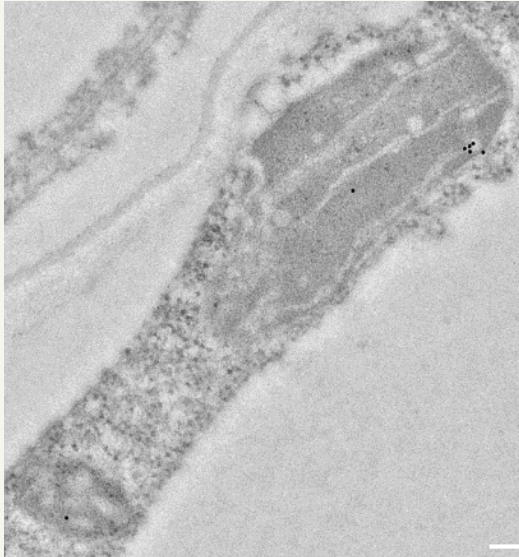


## (B) Post-inclusion

### Racine d'*A.thaliana*

AC DGDG (galactolipide)- marquage plaste et mitochondrie

*J. Marion*



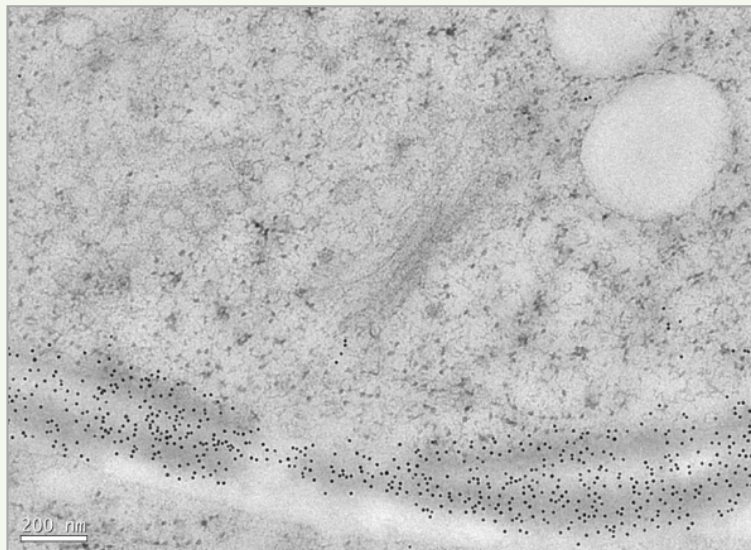
### Points (+) du post-embedding :

- 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

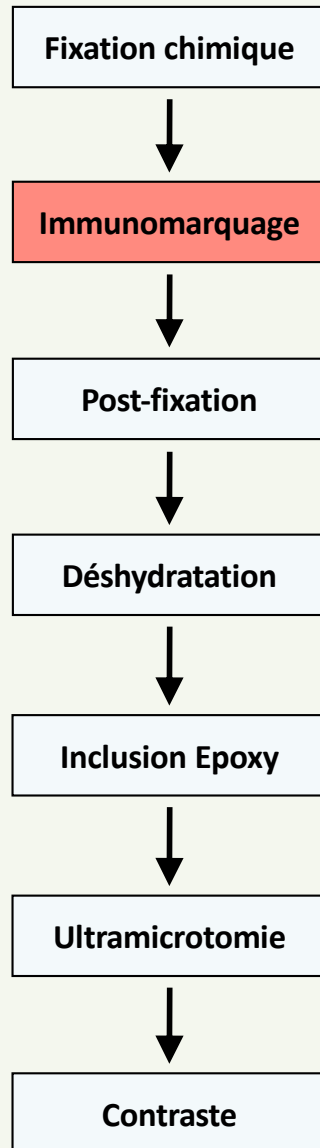
*J. Marion*



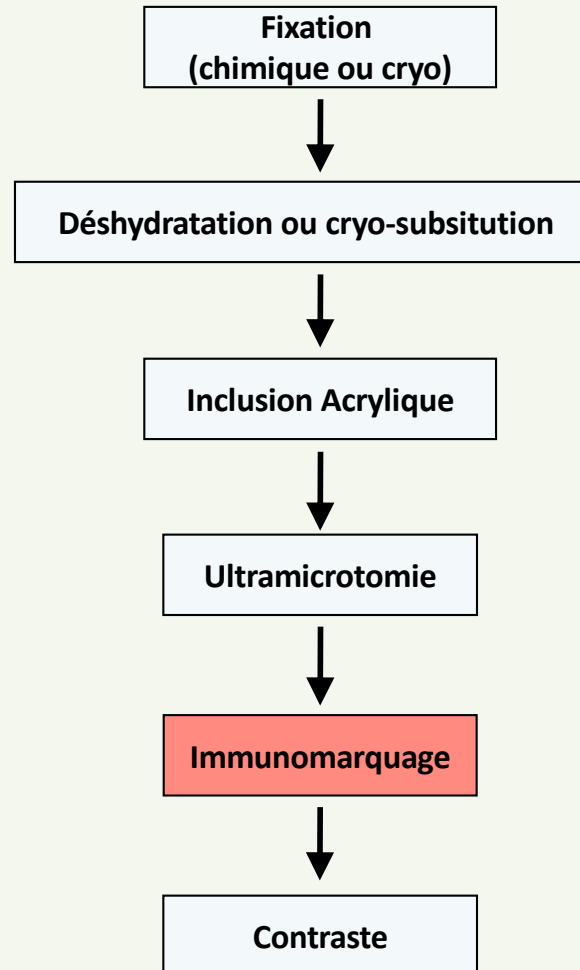
### Points (-) du post-embedding :

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

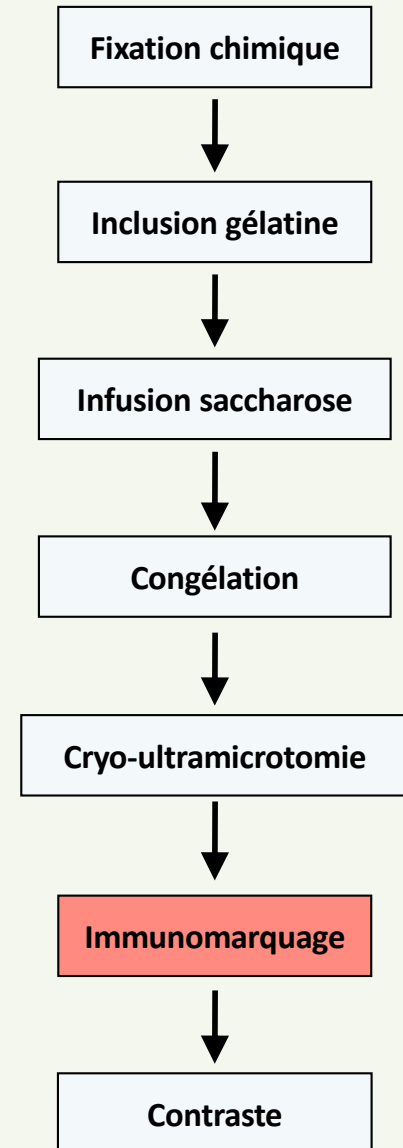
## (A) Pre-inclusion



## (B) Post-inclusion



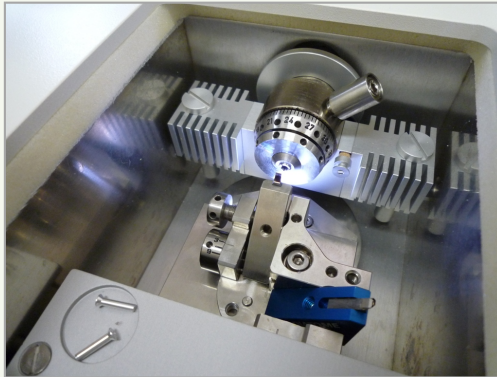
## (C) Tokuyasu



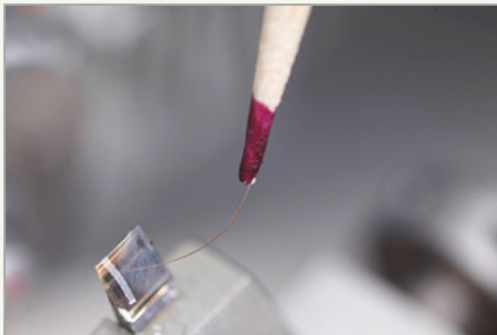
# (C) Méthode de Tokuyasu

## Principe du Tokuyasu :

Durcir échantillon par le froid après cryoprotection



Chambre cryo-ultramicrotome

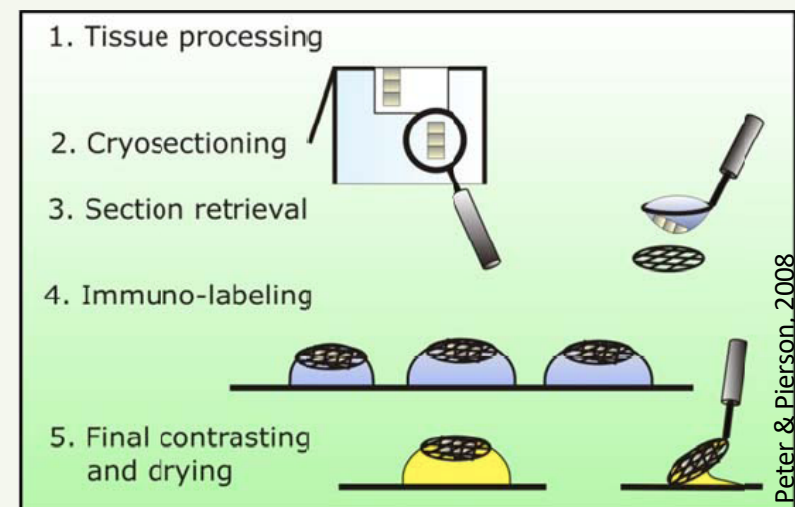
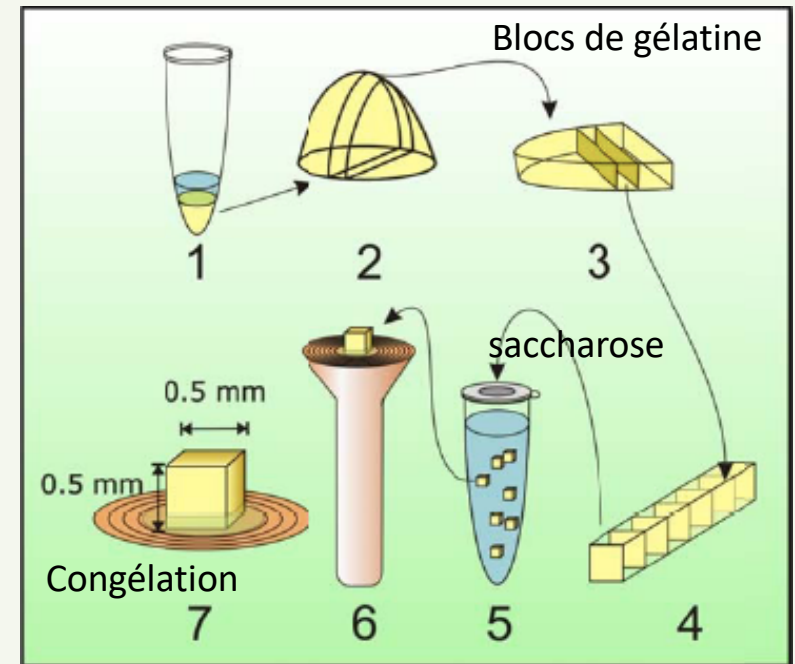


Cryo-section  
(-120° C)



Récupération des  
coupes

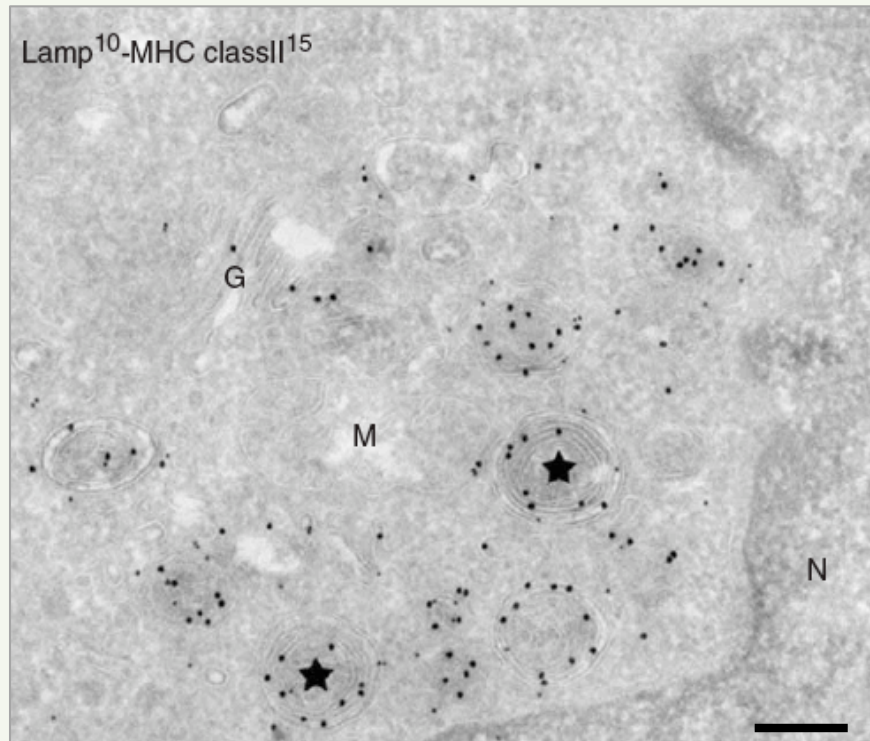
## Préparation échantillon :



## 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

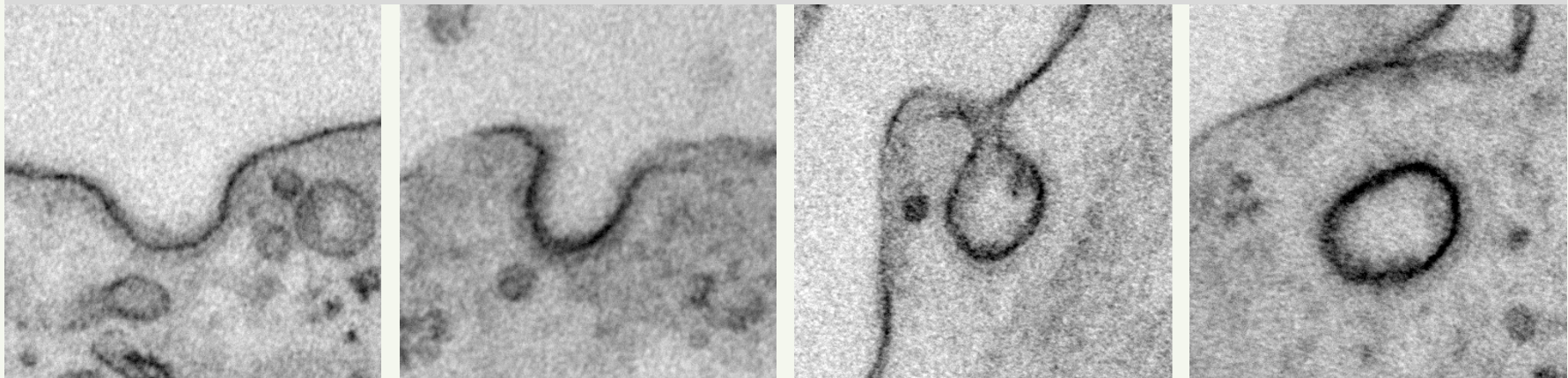
Cyril Basquin<sup>1,2,‡</sup>, Michaël Trichet<sup>3,†</sup>, Helena Vihinen<sup>4,†</sup>, Valérie Malardé<sup>1,2,§,†</sup>, Thibault Lagache<sup>5,2,†</sup>, Léa Ripoll<sup>1,2,¶</sup>, Eija Jokitalo<sup>4</sup>, Jean-Christophe Olivo-Marin<sup>5,2</sup>, Alexis Gautreau<sup>6</sup> & Nathalie Sauvonnet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

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

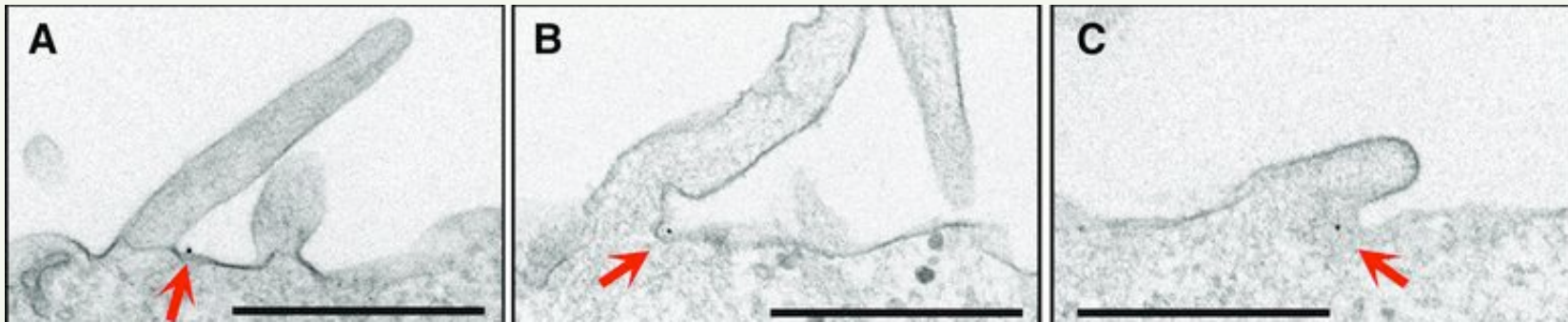
### IL-2R :

- 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

### 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 $\beta$	7	220	271	243
Kit225	0	40	127	221
<b>total</b>	<b>7</b>	<b>260</b>	<b>398</b>	<b>464</b>

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.

# Exemple d'application

IL-2R à la base de protrusions cellulaires

