

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

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

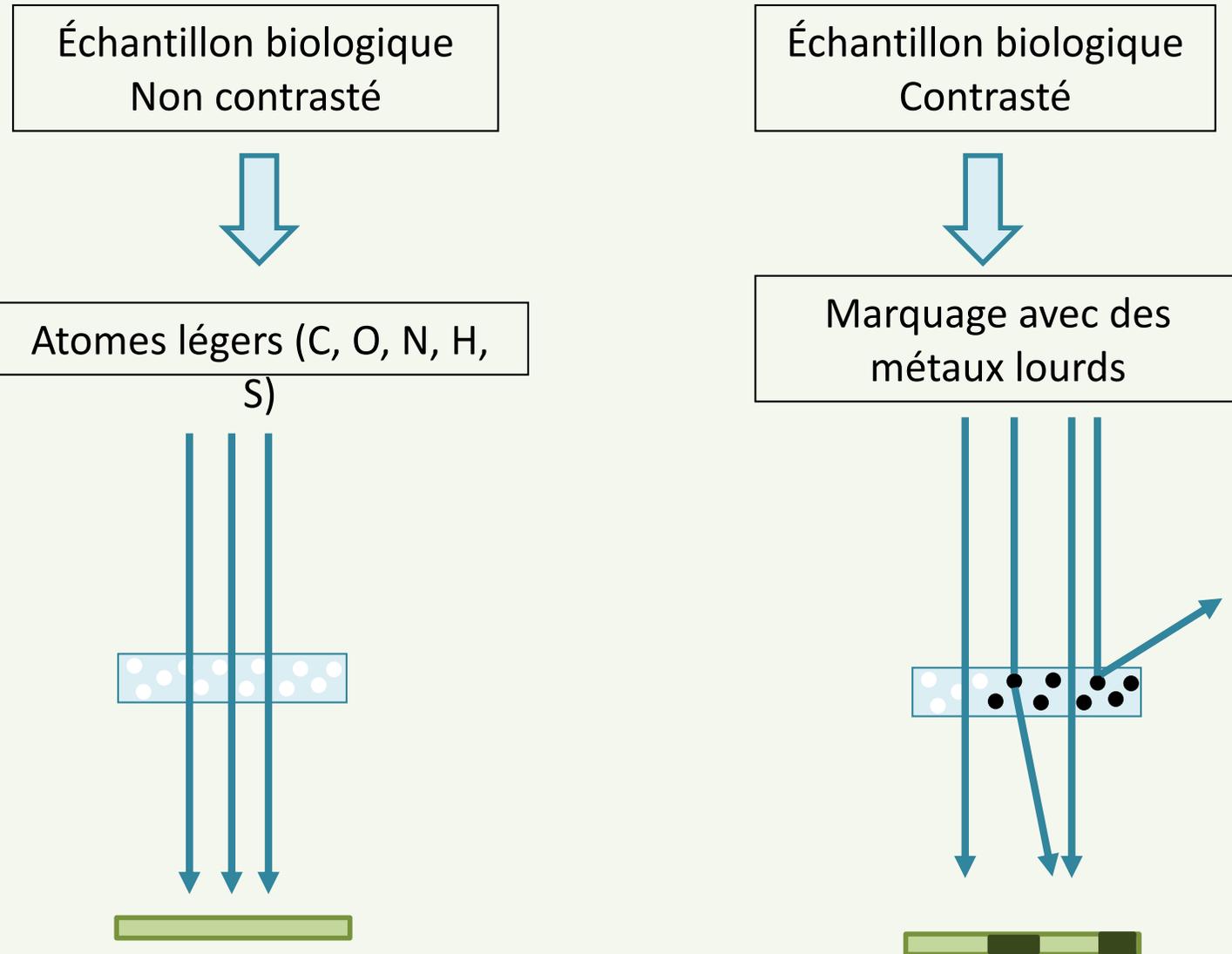
**Jessica MARION**  
Imagerie-Gif  
I2BC  
Gif-sur-Yvette

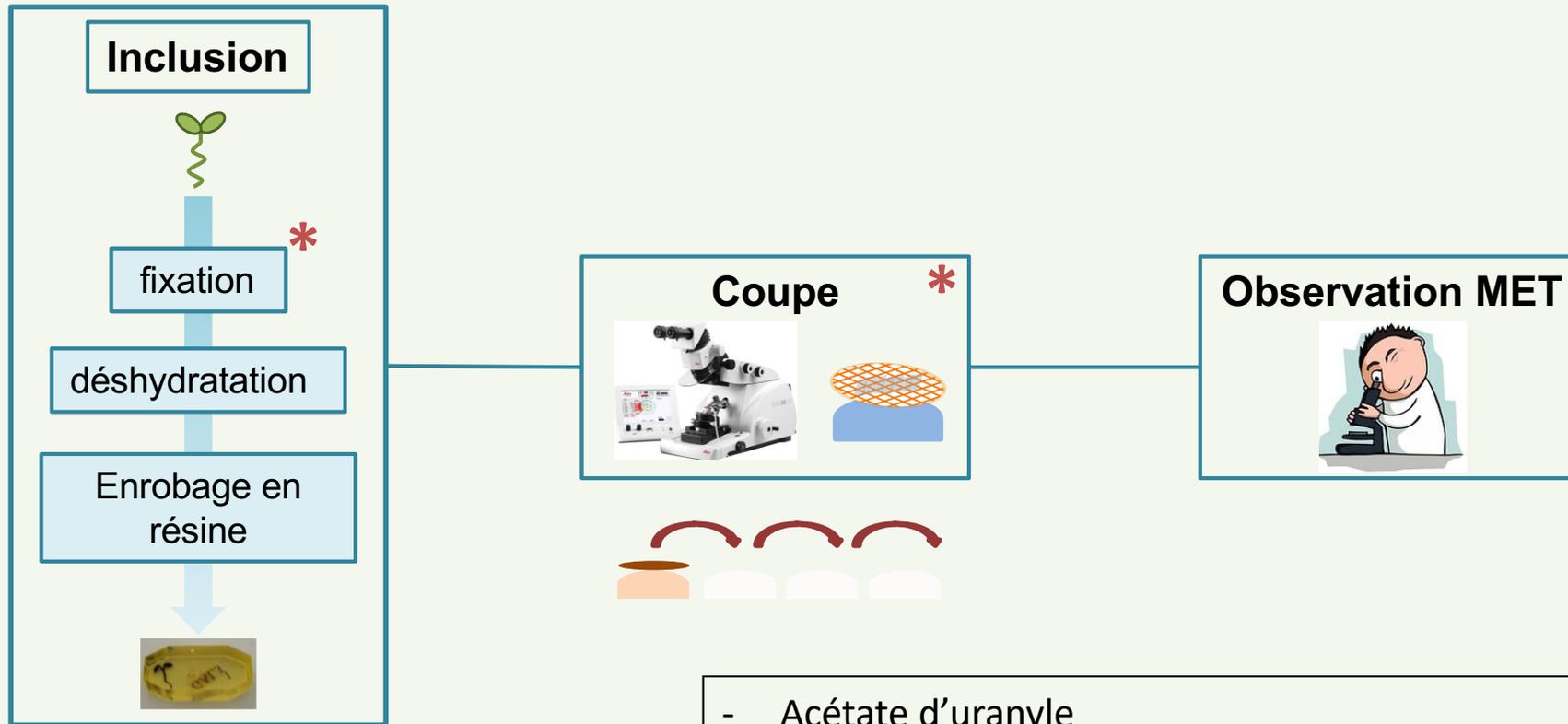


**Michaël TRICHET**  
Service de Microscopie Electronique  
Institut de Biologie Paris-Seine  
Sorbonne-Université



# La cytochimie





\* **Contraste des coupes sur grille**

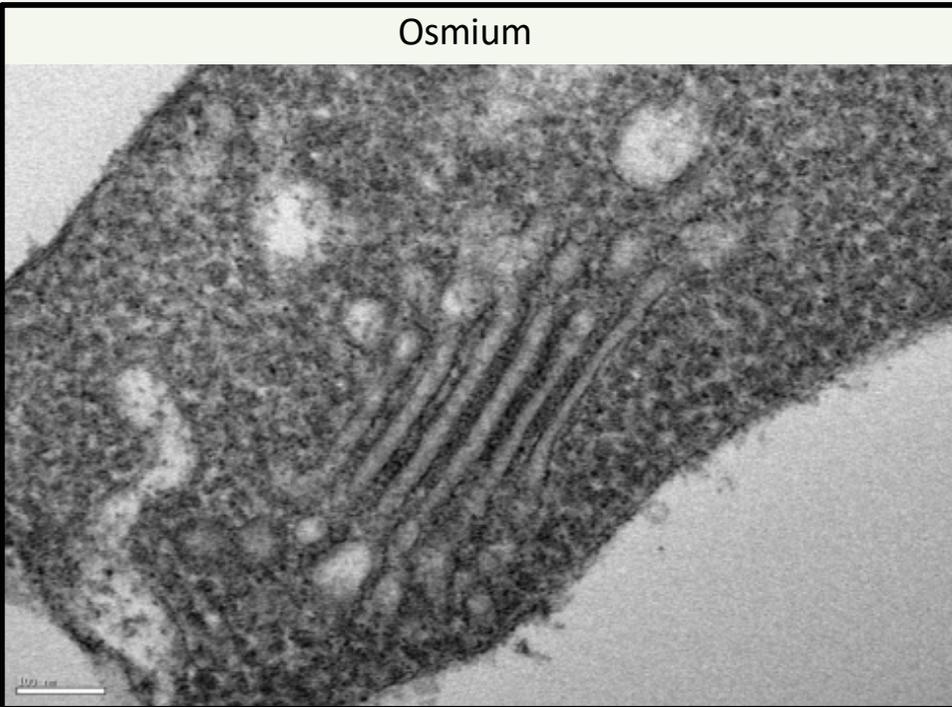
\* **Post-fixation ou contraste en bloc**

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

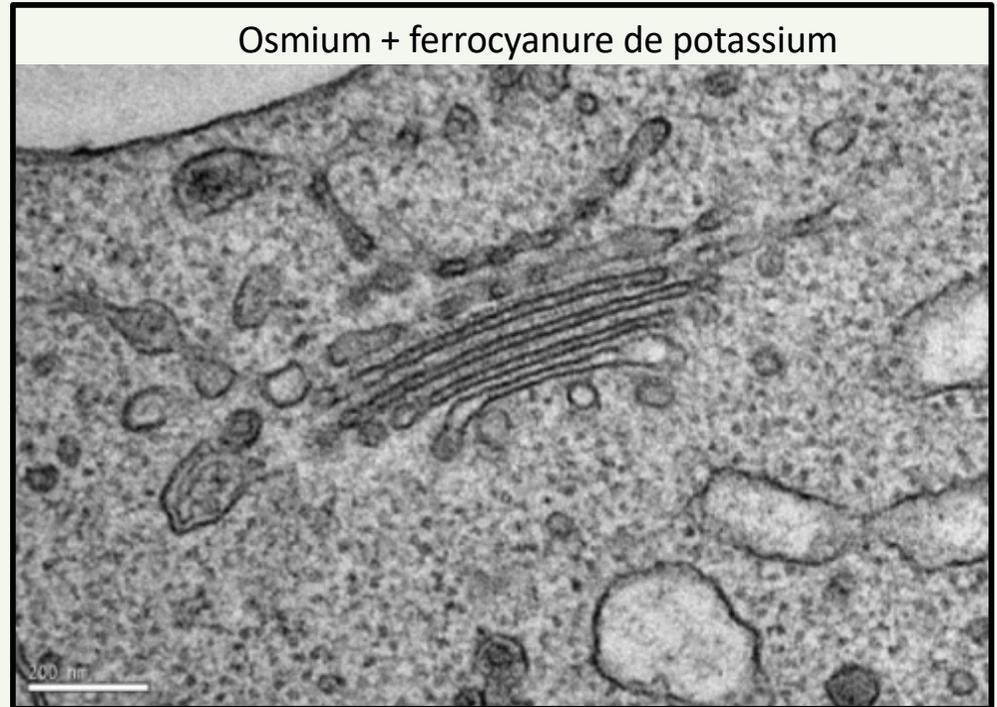
- Osmium
- Osmium + ferrocyanure de potassium
- Osmium + acide tannique
- Osmium + Zinc + iode
- Acétate d'uranyle

Augmente contraste des membranes

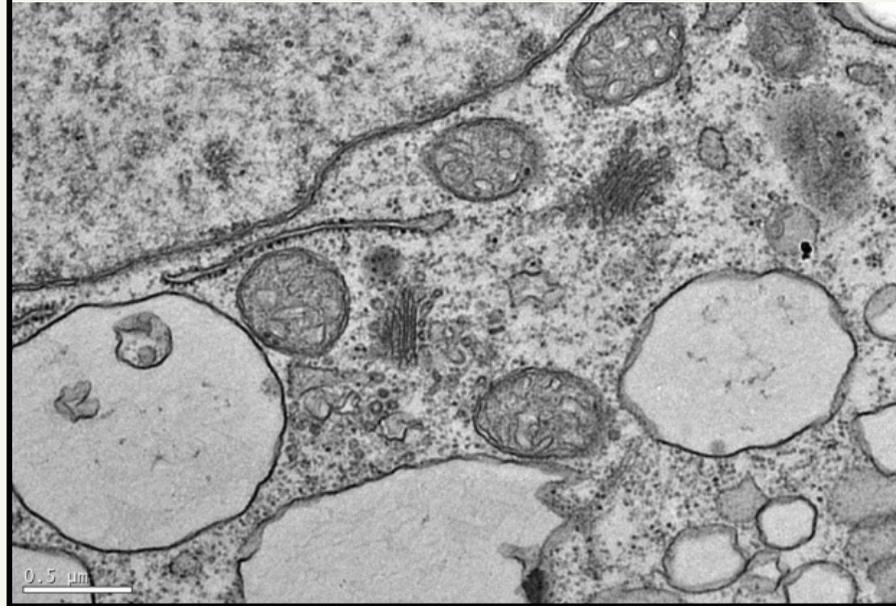
Osmium



Osmium + ferrocyanure de potassium

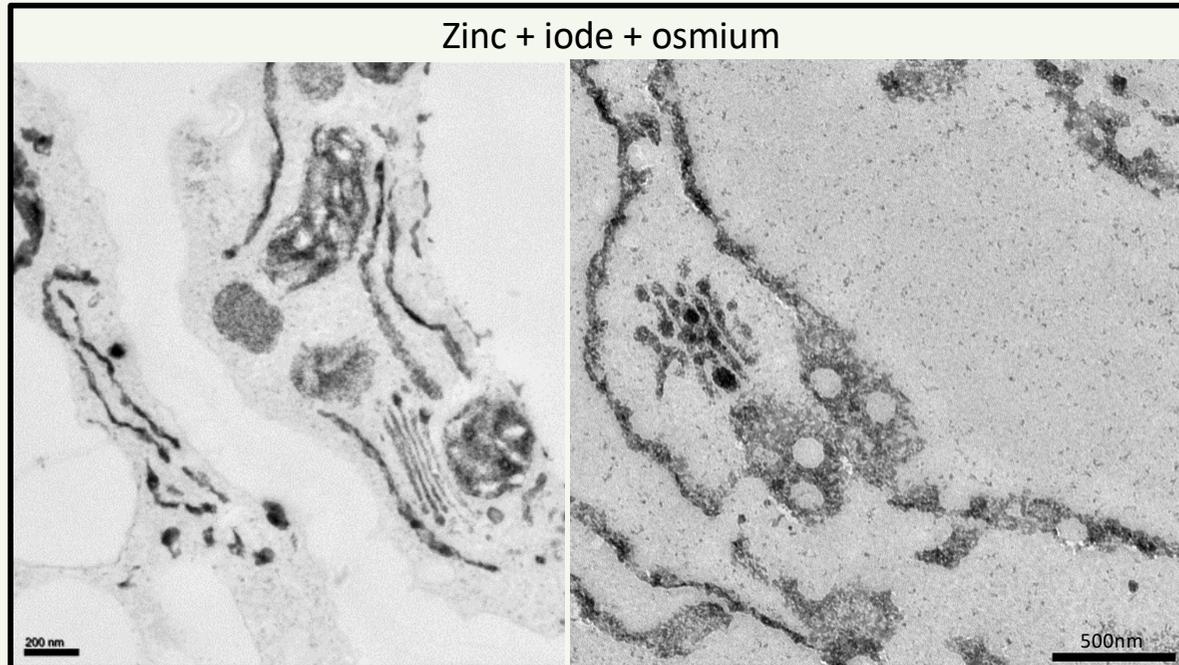


Osmium + ferrocyanure de potassium



Marquage  
dense du RE

Zinc + iode + osmium

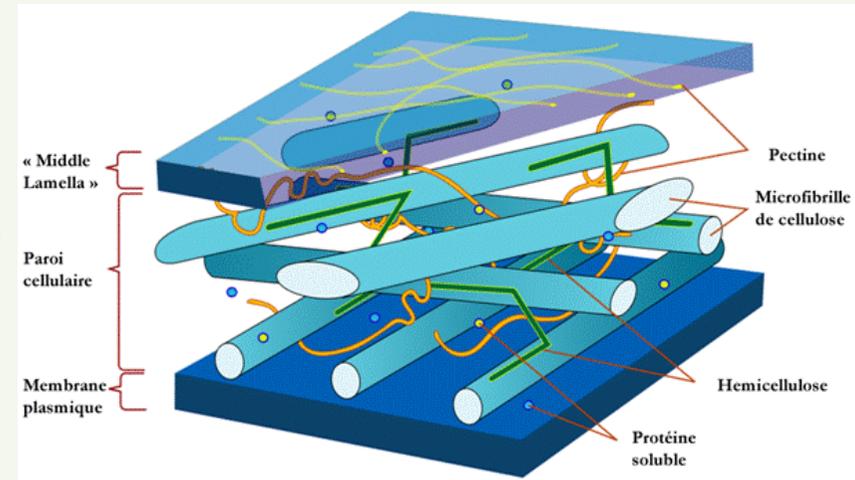


# Mise en évidence de composés spécifiques

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

.....

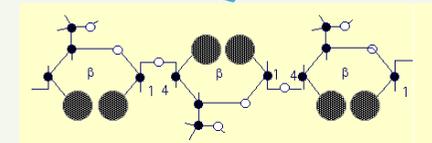
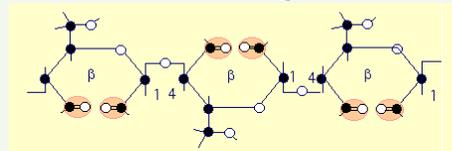
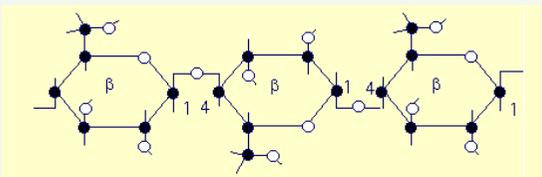
- Test du PATAg  
 Periodic Acid- Thiocarbohydrazide-Argent proteinate  
 Exemple : la paroi végétale



Acide périodique

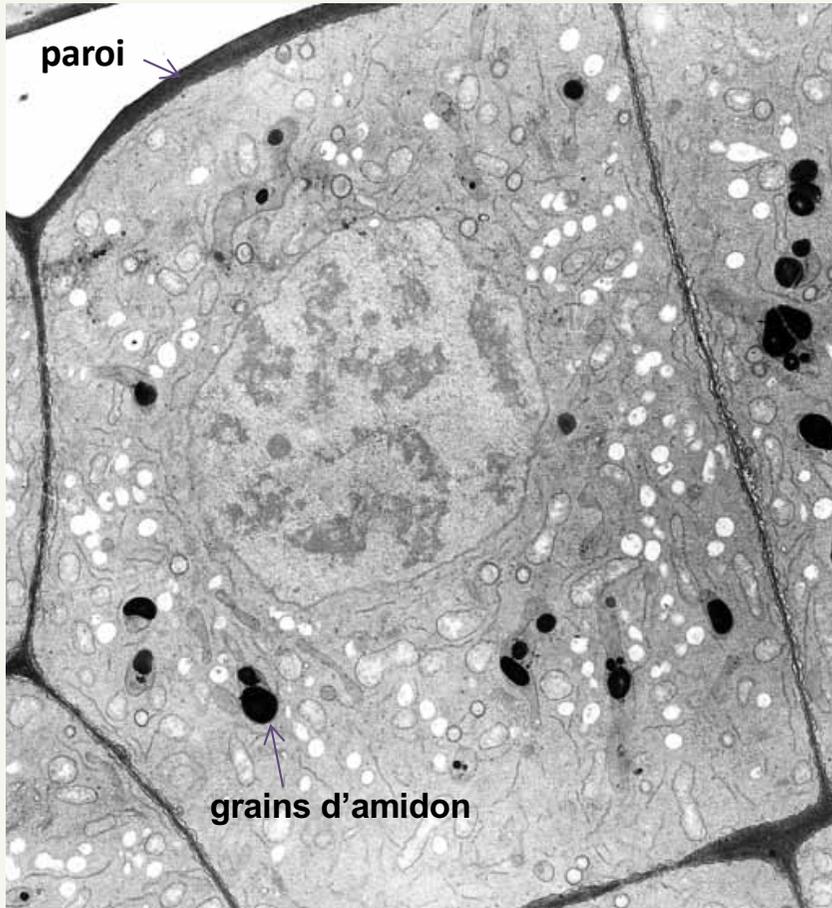
Thiocarbohydrazide et protéinate d'argent

## La cellulose

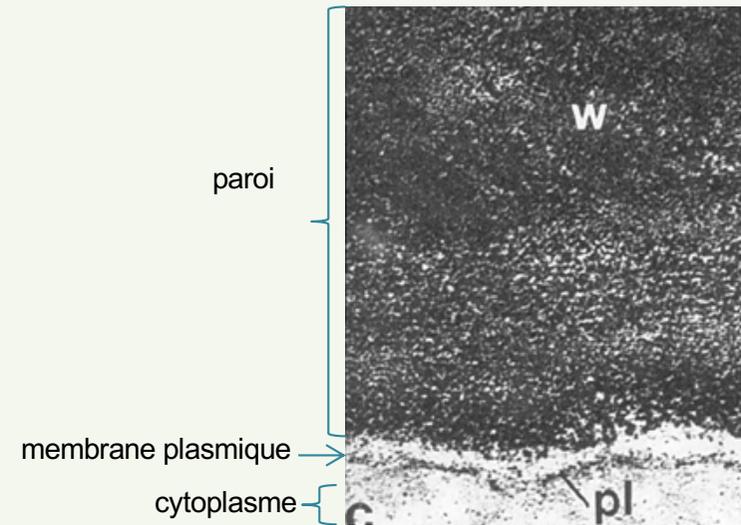


- Test du PATAg

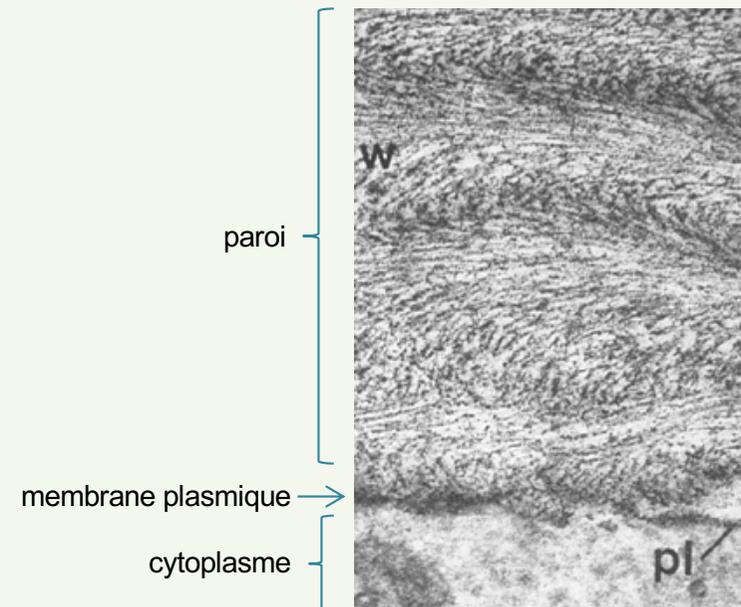
## Cellule de racine



## Zoom de la paroi



↓ Digestion enzymatique partielle des hémicellulose/pectine

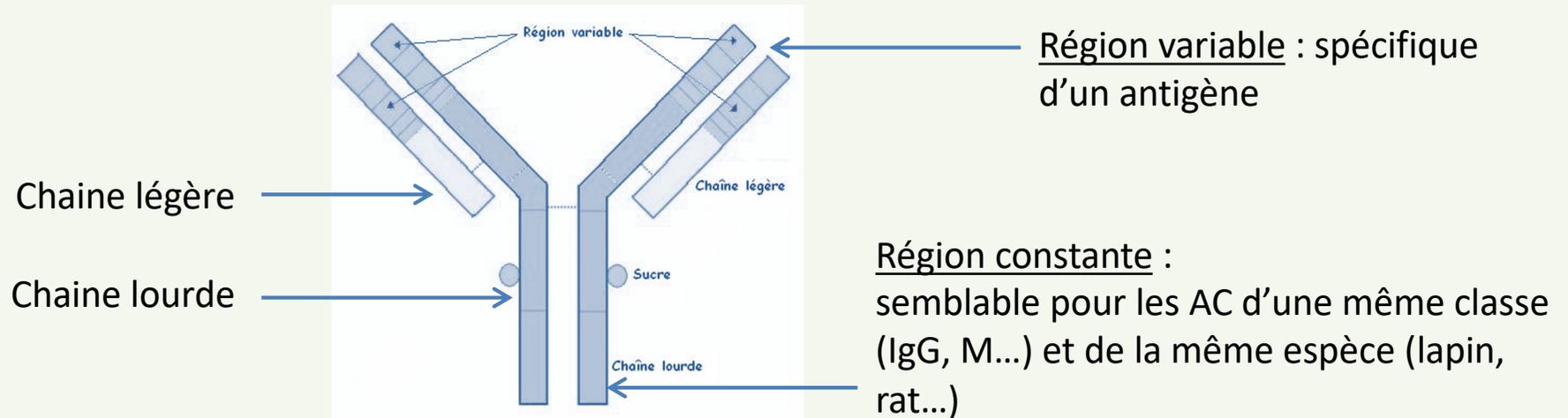


# L'immunomarquage

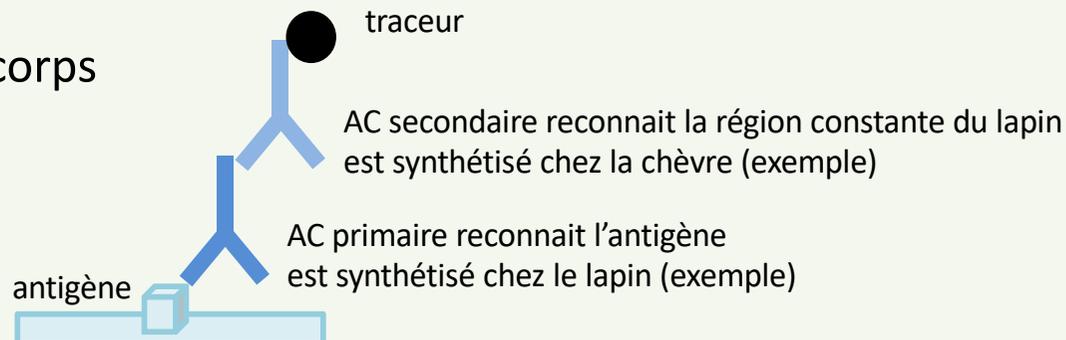
## Le principe

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

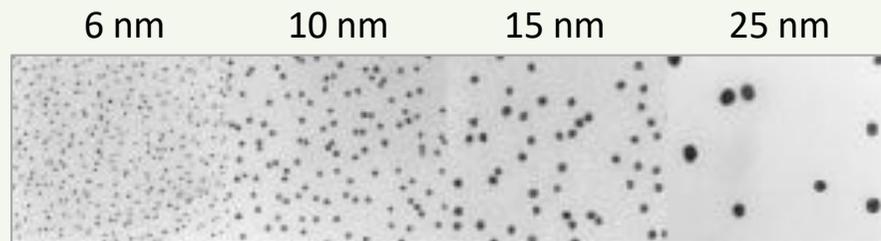


## Les traceurs

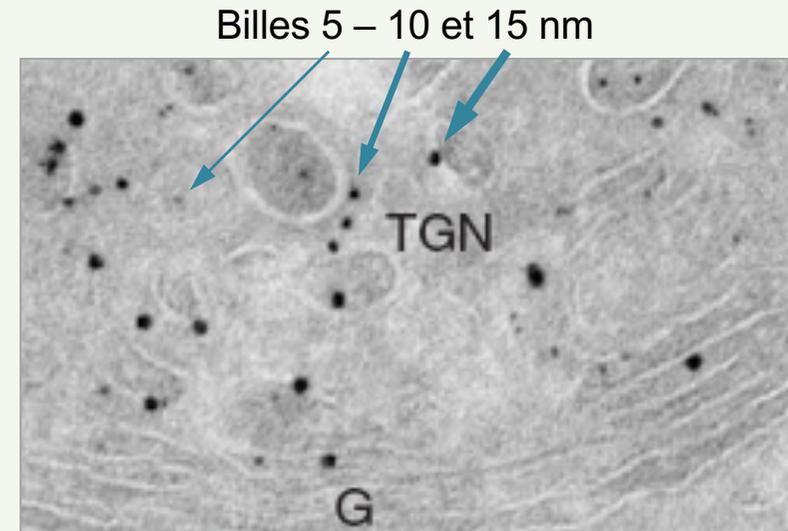
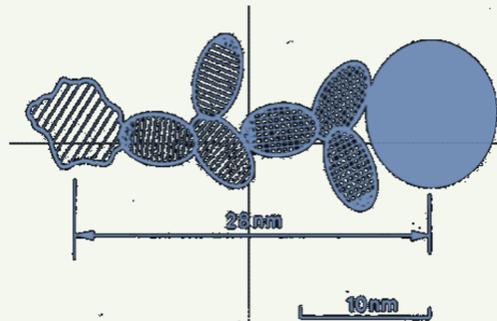
élément couplé à l'AC IIaire et permettant de le détecter au MET

### • Bille d'or colloïdal :

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

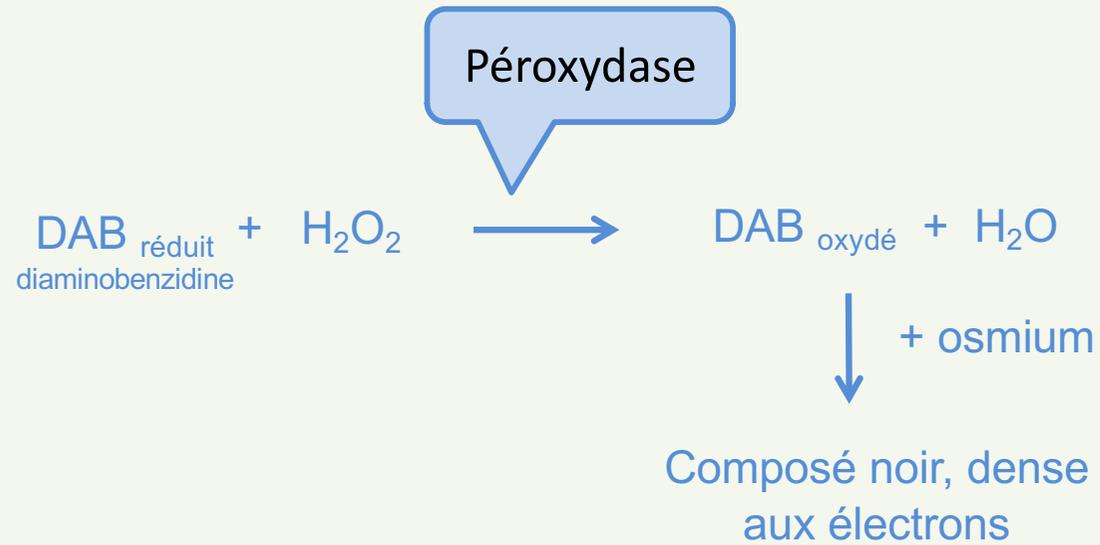


Aurion

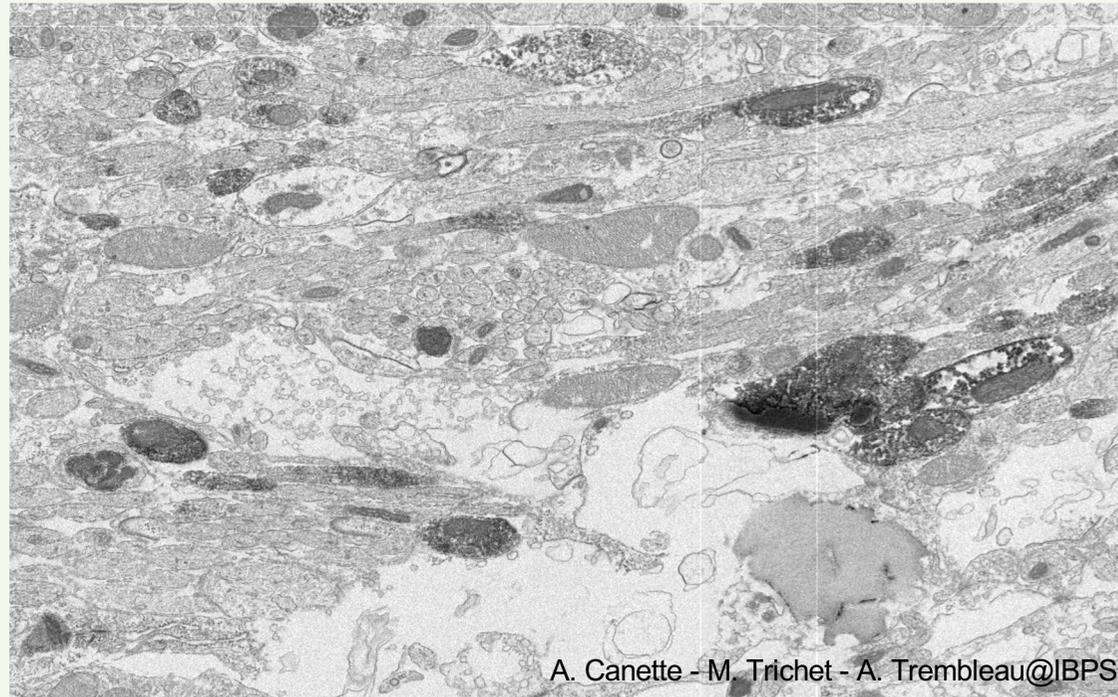


Cellule hépatocyte humaine.  
G: Golgi, TGN: Trans Golgi Network  
Slot & Geuze, 2007

- 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<br>PBS-BSA              | lavages  |
| <b>Anticorps secondaire</b> |  |
| PBS<br>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

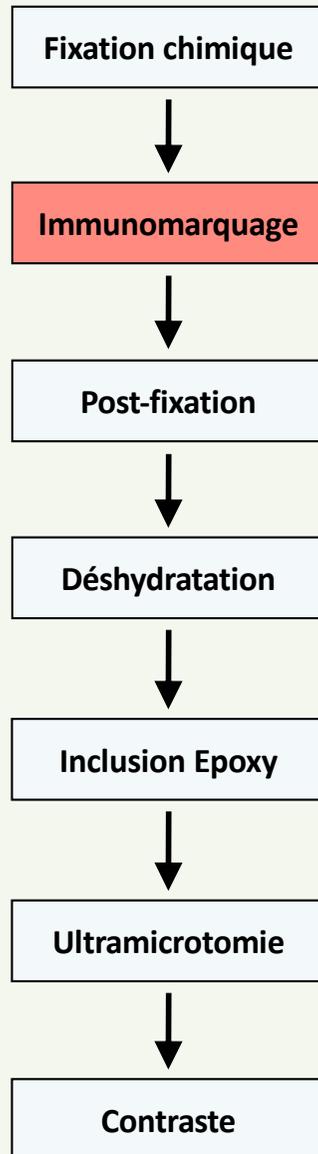
- Inerte
- **Préserve l'ultrastructure**
- **Masquage antigènes**

#### Acrylique

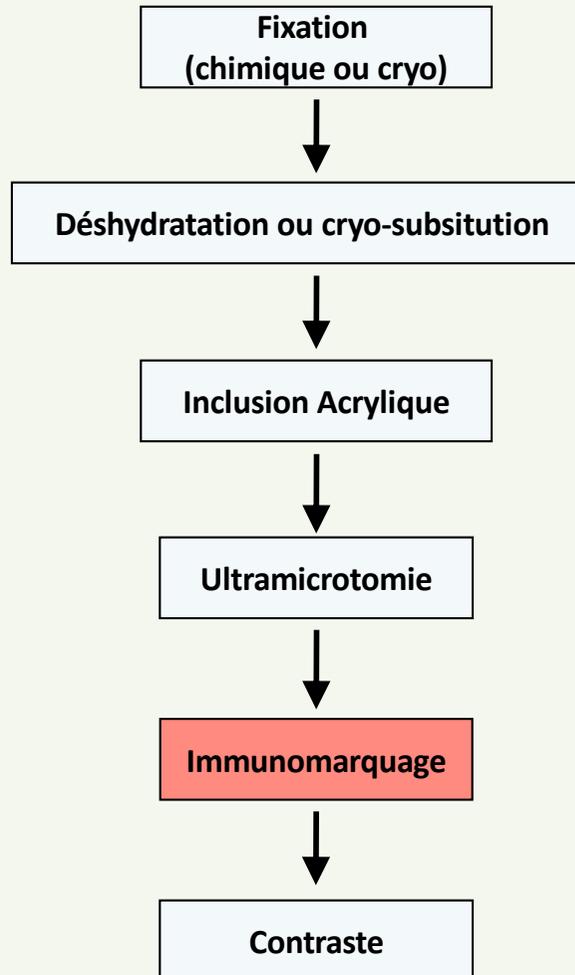
- Extraction
- **Préserve l'antigénicité**
- **Altère l'ultrastructure**

*Inclusion à basse température*

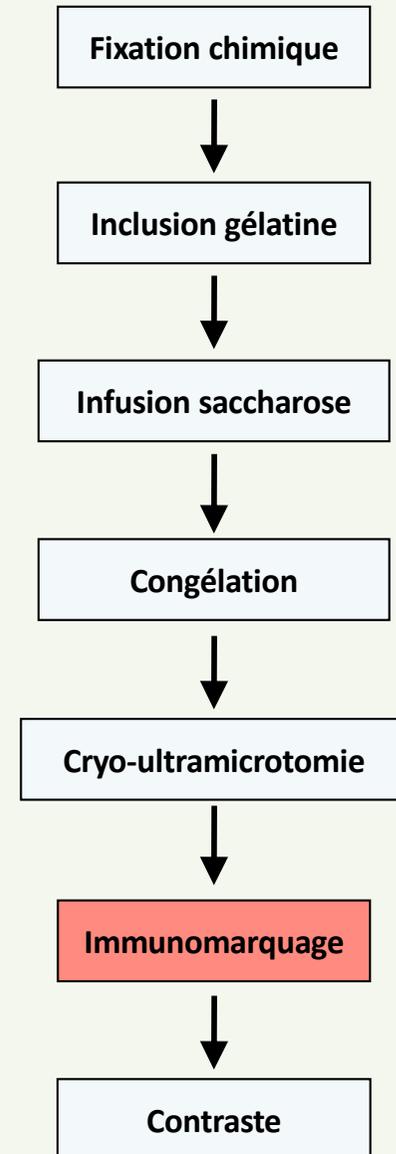
## (A) Pre-inclusion



## (B) Post-inclusion



## (C) Tokuyasu

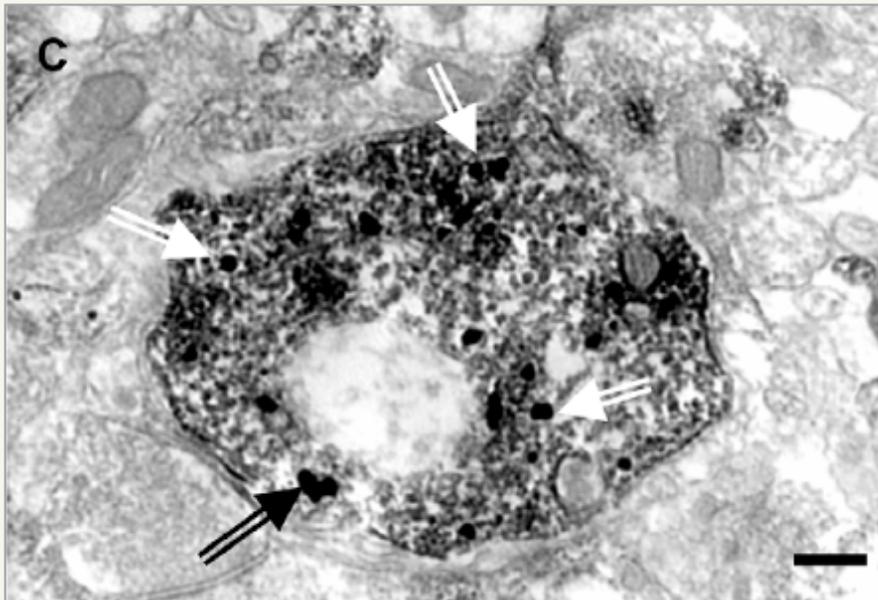
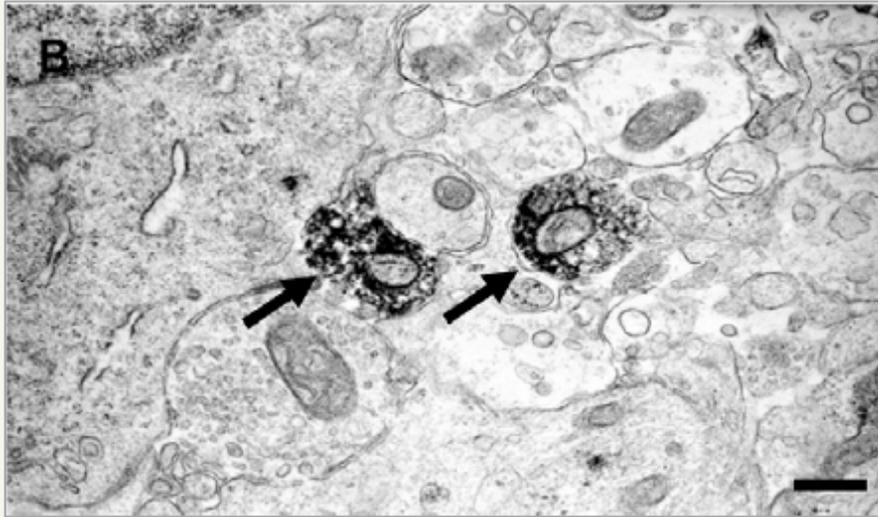


# (A) Pre-inclusion

## Coupe de cerveau de rat

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

*Egginger et coll., 2011*



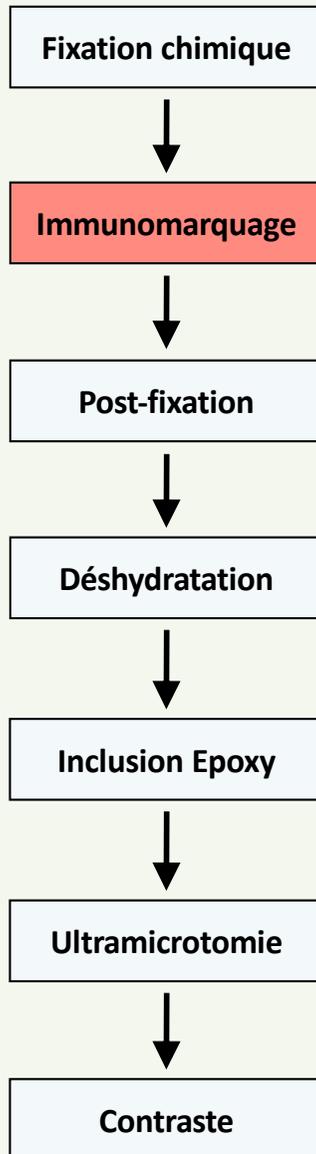
### Points (+) du pre-embedding :

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

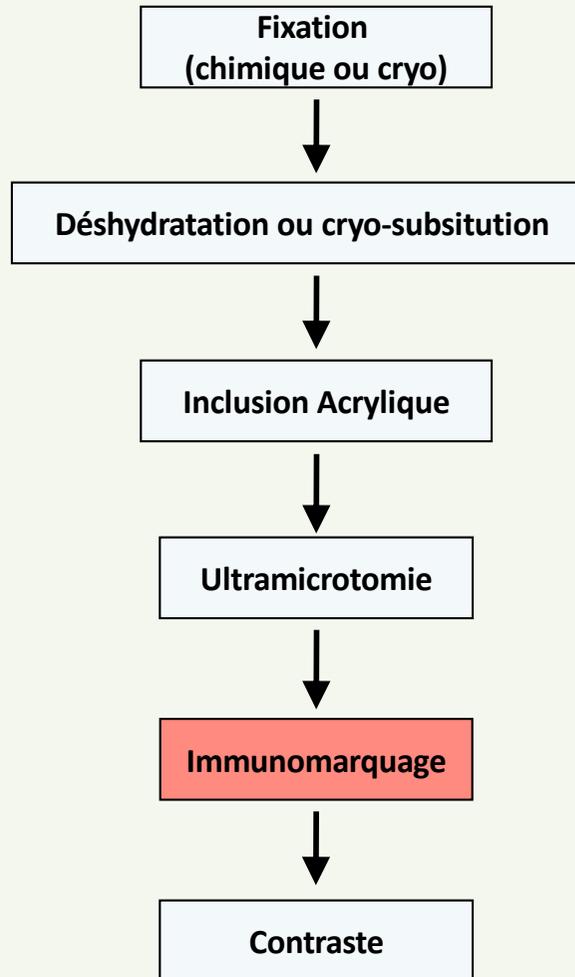
### Points (-) du pre-embedding :

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

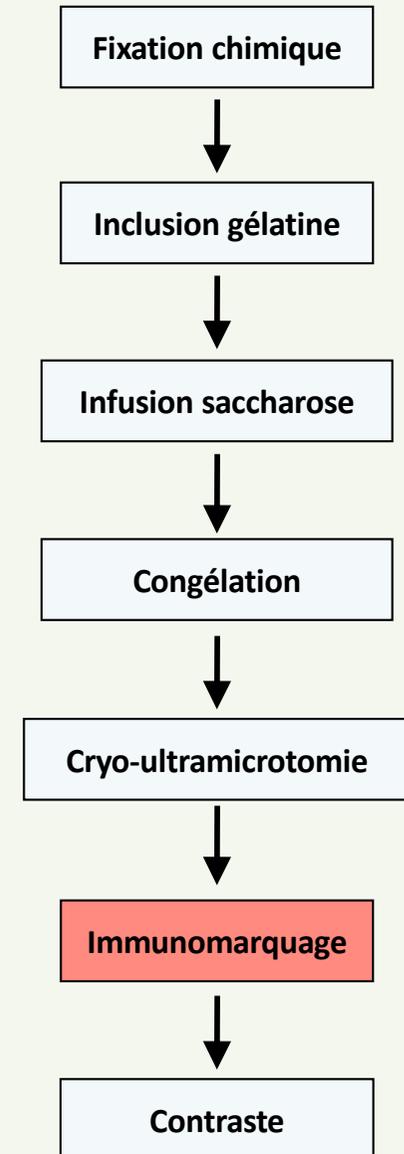
## (A) Pre-inclusion



## (B) Post-inclusion



## (C) Tokuyasu

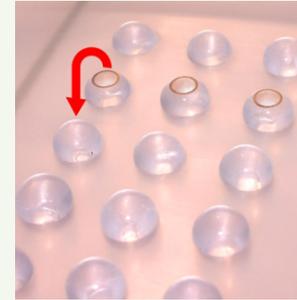
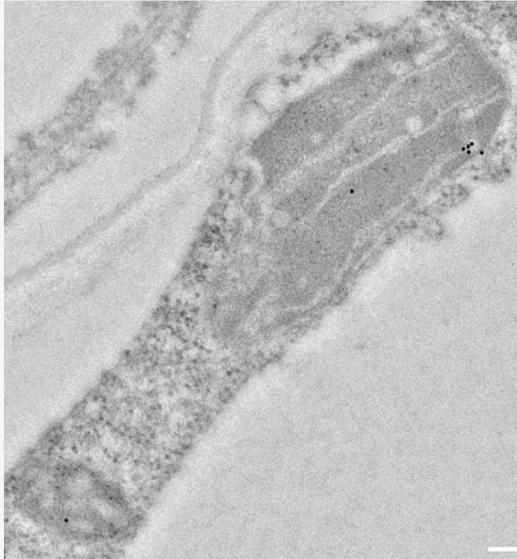


## (B) Post-inclusion

### Racine d'*A.thaliana*

AC DGDG (galactolipide)- marquage plaste et mitochondrie

*J. Marion*



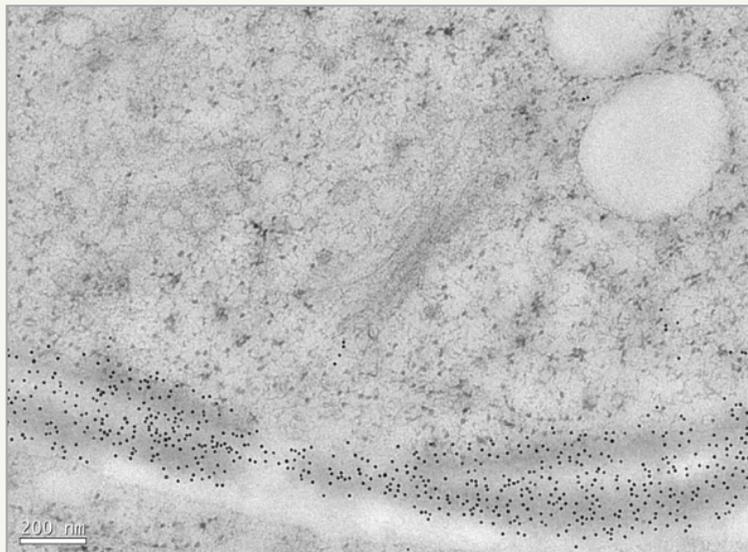
### Points (+) du post-embedding :

- 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

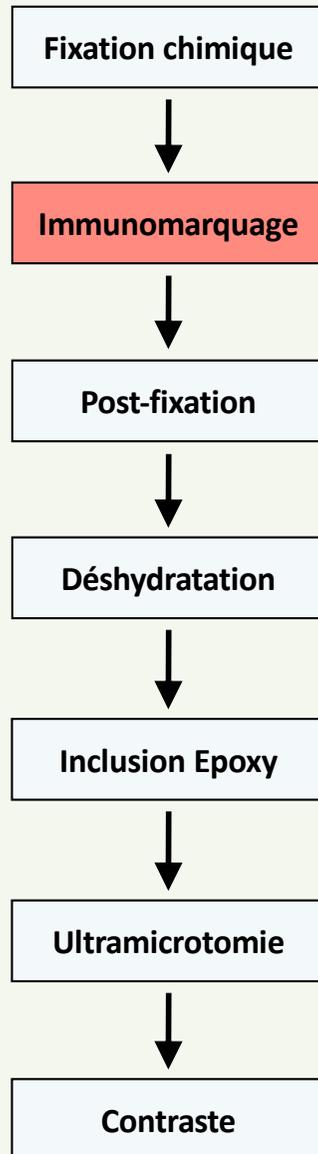
*J. Marion*



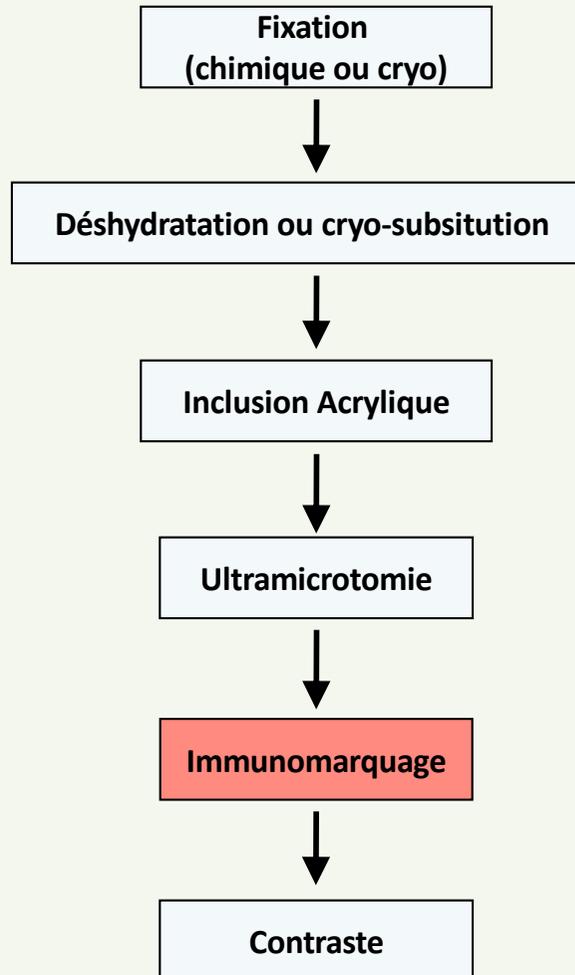
### Points (-) du post-embedding :

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

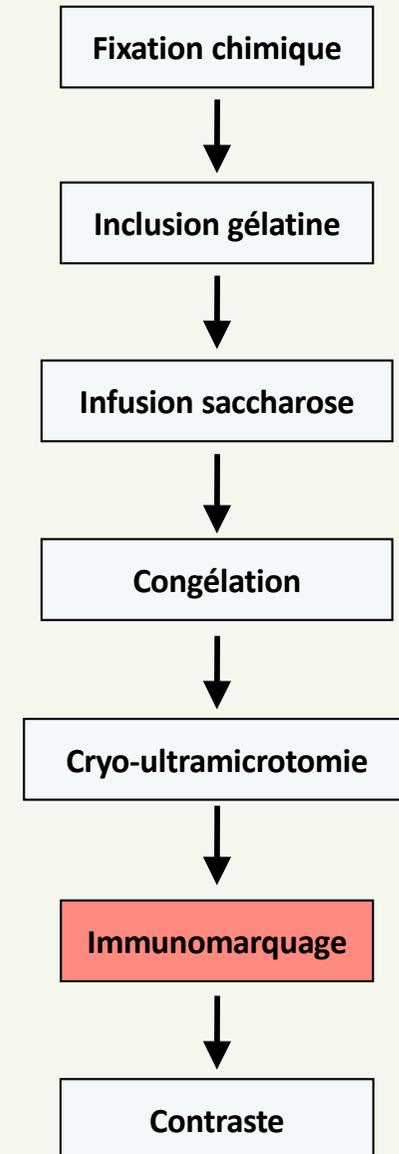
## (A) Pre-inclusion



## (B) Post-inclusion



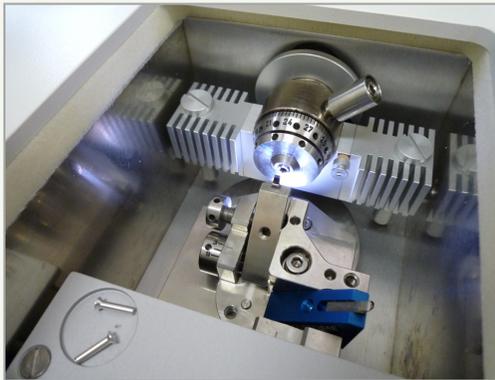
## (C) Tokuyasu



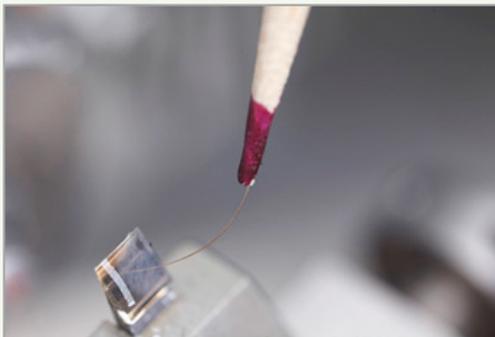
# (C) Méthode de Tokuyasu

## Principe du Tokuyasu :

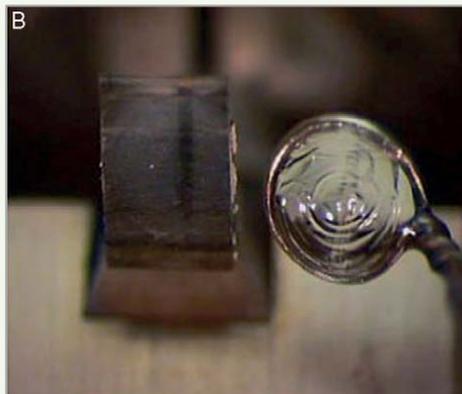
Durcir échantillon par le froid après cryoprotection



Chambre cryo-ultramicrotome

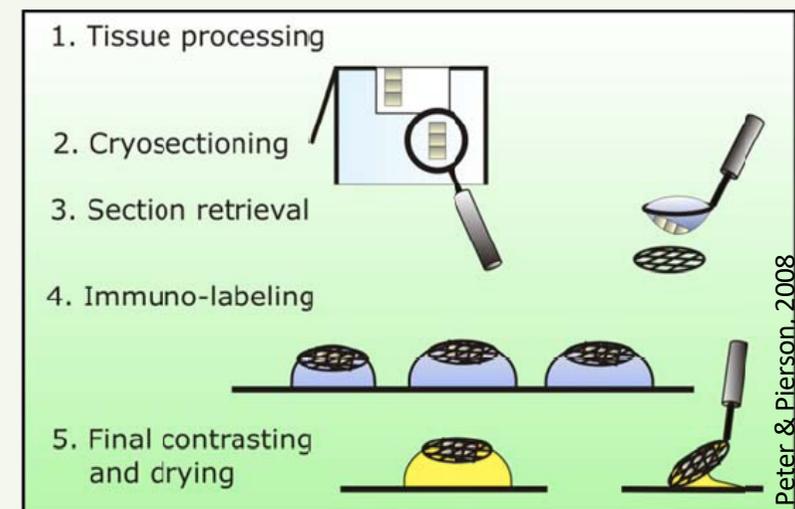
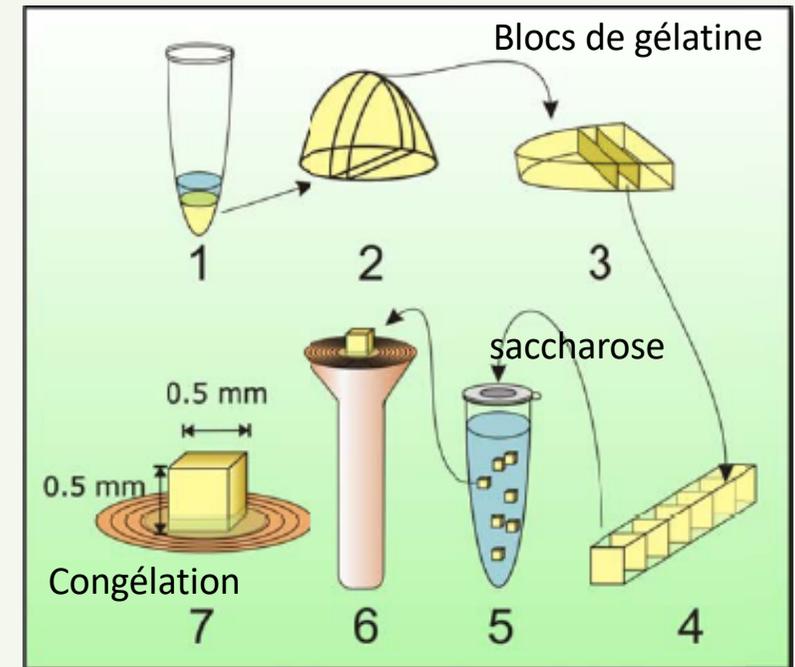


Cryo-section  
(-120° C)



Récupération des  
coupes

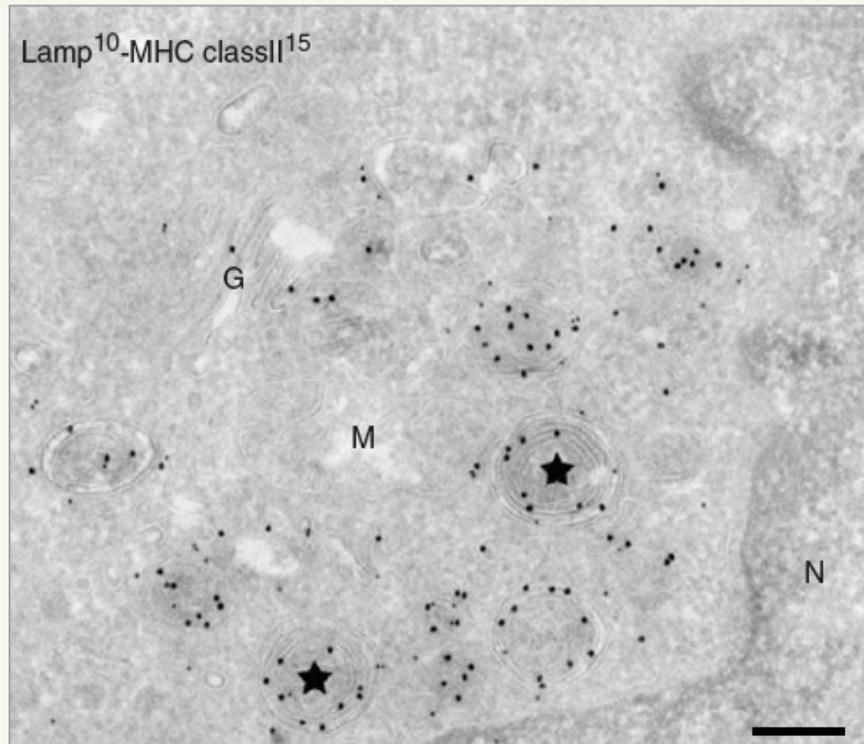
## Préparation échantillon :



## 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

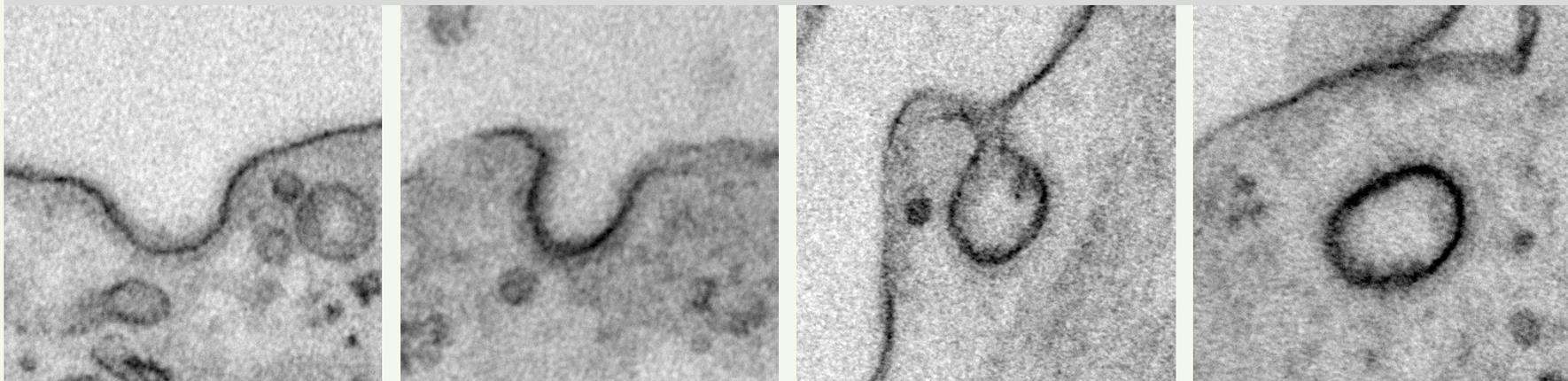
Cyril Basquin<sup>1,2,‡</sup>, Michaël Trichet<sup>3,†</sup>, Helena Vihinen<sup>4,†</sup>, Valérie Malardé<sup>1,2,§,†</sup>, Thibault Lagache<sup>5,2,†</sup>, Léa Ripoll<sup>1,2,¶</sup>, Eija Jokitalo<sup>4</sup>, Jean-Christophe Olivo-Marin<sup>5,2</sup>, Alexis Gautreau<sup>6</sup> & Nathalie Sauvonnet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

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

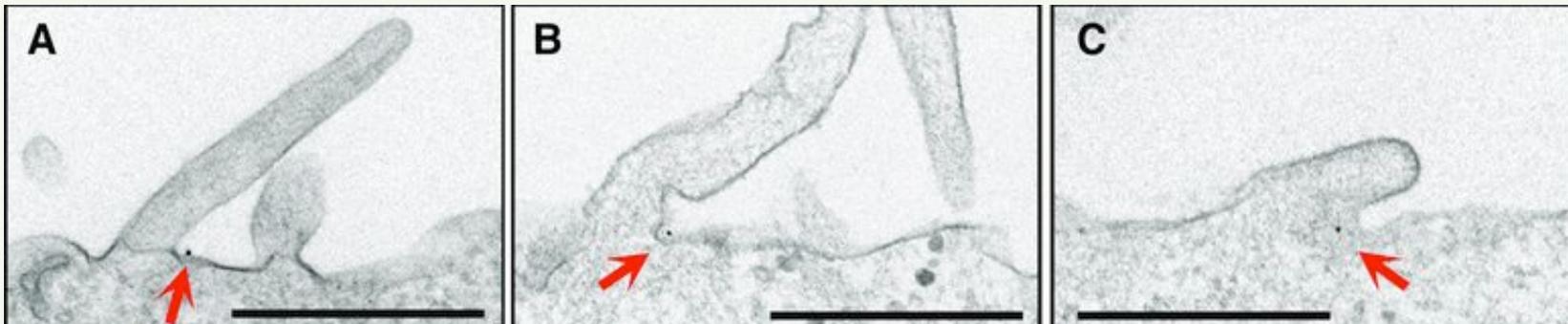
### IL-2R :

- 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.

IL-2R à la base de protrusions cellulaires

