



Préparation des échantillons pour l'immunohistochimie

Application à la microscopie confocale

- **Microscopie confocale : Principe et Pratique**
- Formation permanente INSERM – ADR Grand Ouest
- 19-22 mai 2008

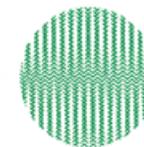
Laurence DUBREIL

Responsable Microscopie confocale

UMR 703 INRA

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

laurence.dubreil@vet-nantes.fr



INRA

Institut National de la Recherche Agronomique



Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Préparation des échantillons pour l'immunohistochimie. Application à la microscopie confocale

- 1- Intérêts microscopie confocale en immunohistochimie**
- 2- Matériel le plus approprié à la microscopie confocale**
- 3- Protocole classique de congélation des tissus animaux**
- 4- Coupes à congélation**
- 5- Fixation des coupes avant immunomarquage**
- 6- Choix des sondes fluorescentes**
- 7- Milieux de montage**

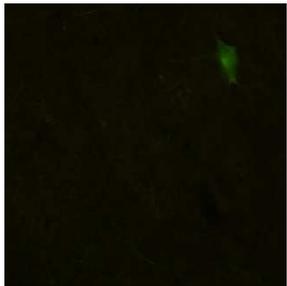
Intérêts de la microscopie confocale en immunohistochimie

- travailler sur des coupes épaisses

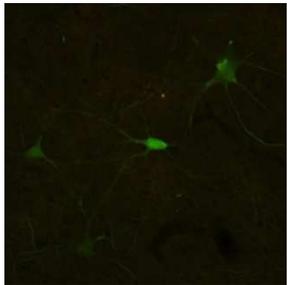
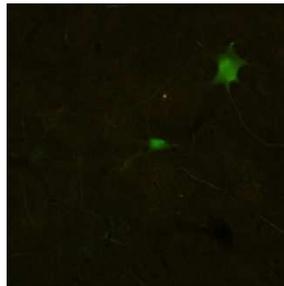
Coupe épaisse d'encéphale (50 μm)

Galerie

Z0



Z0 +10 μm



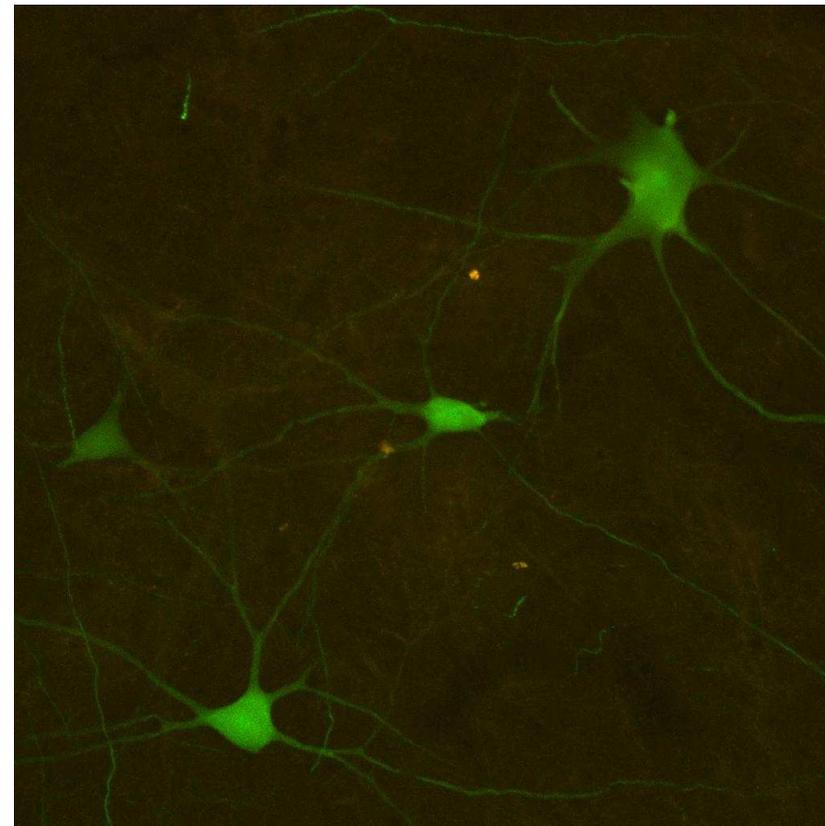
Z0 +20 μm



Z0 +30 μm

Expression de la GFP dans les neurones

Projection en Z



Compilation de tous les plans

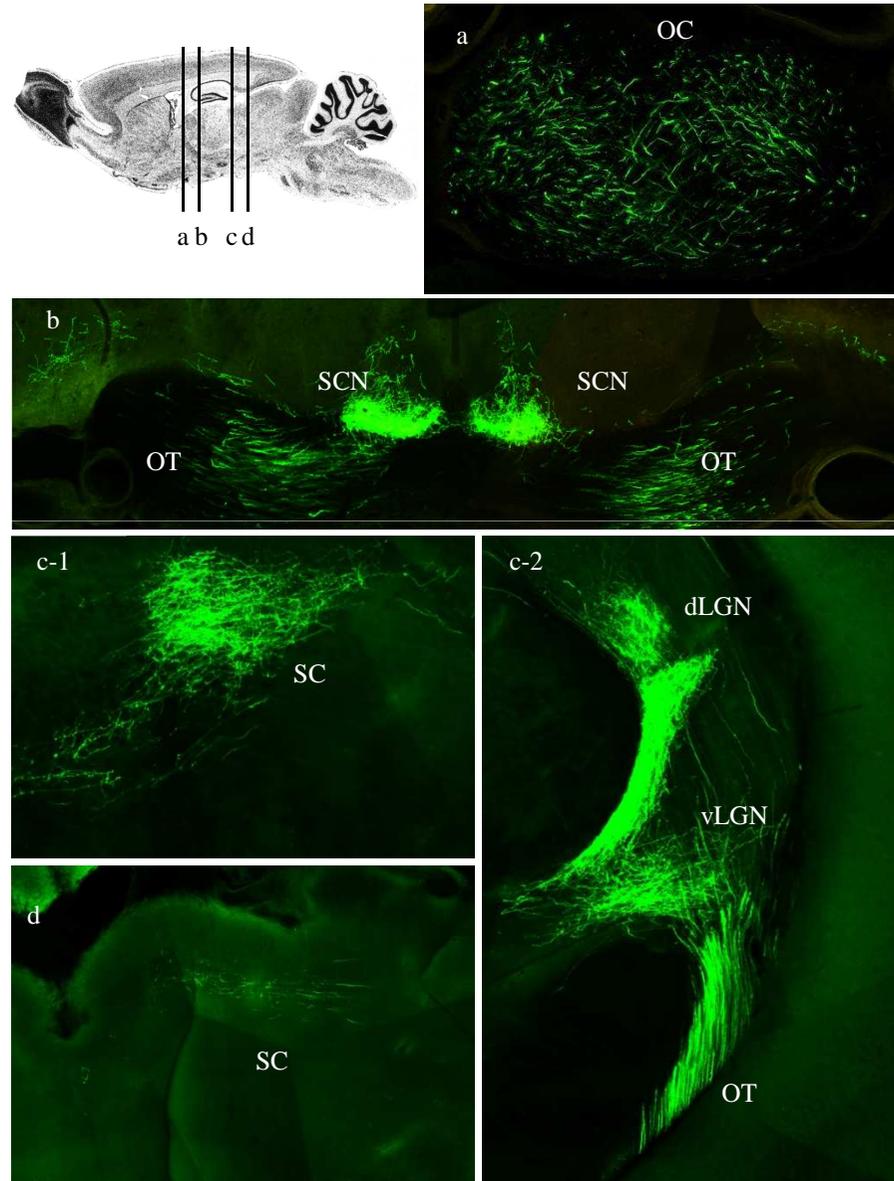
Intérêts de la microscopie confocale en immunohistochimie

- Coupe épaisse (100µm) pour rechercher un signal fluorescent exprimé *in situ* (ex : GFP), gain de temps pour le screening d'un organe

Recherche d'un signal GFP dans le cerveau de rat

- OC Chiasma optique
- SNC Noyaux supra-chiamatiques
- OT Tractus optique (Bandelette optique)
- LGN Corps géniculé latéral
- SC Colliculus supérieur

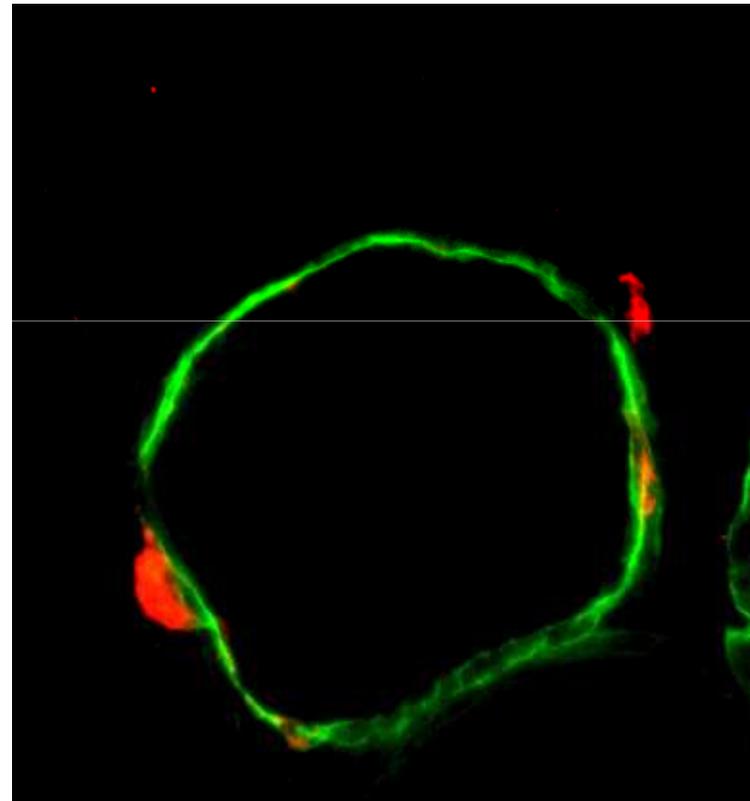
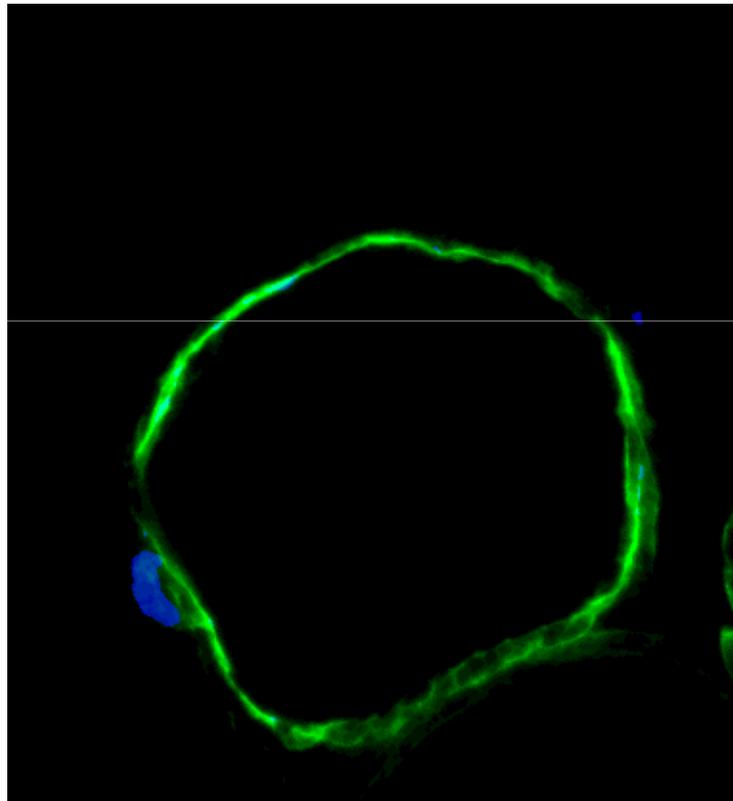
Mol Ther. 2008 May;16(5):916-23



Intérêts de la microscopie confocale en immunohistochimie

- visualiser plusieurs marqueurs sur une même coupe avec une bonne résolution en Z

Coupe de muscle, projection en Z



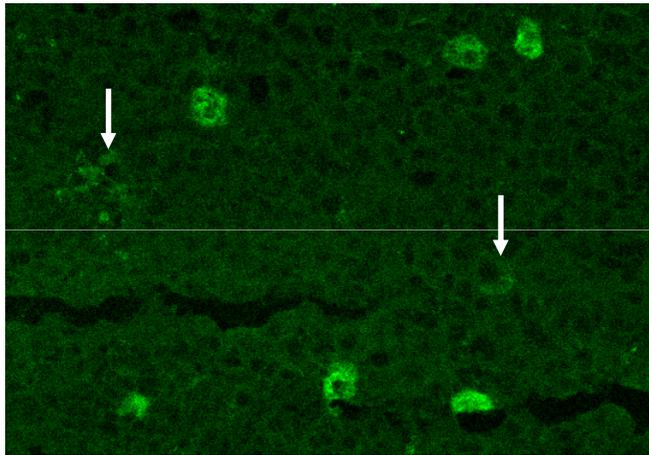
Triple immunomarquage, dystrophine (vert), β gal (rouge), pax7 (bleu)

Intérêts de la microscopie confocale en immunohistochimie

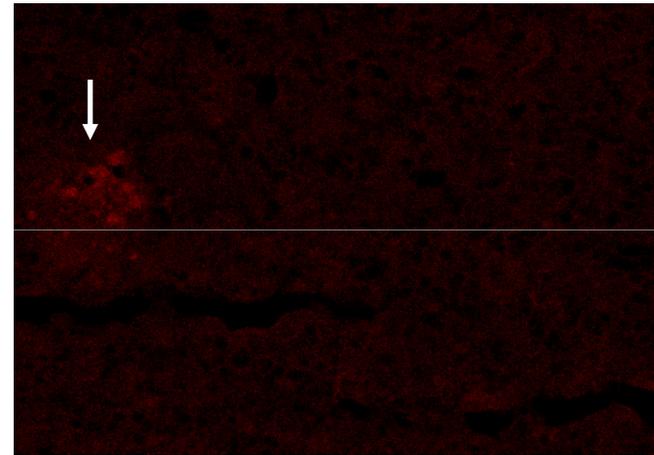
- différencier autofluorescence et signal spécifique par séparation spectrale.

Coupe de foie

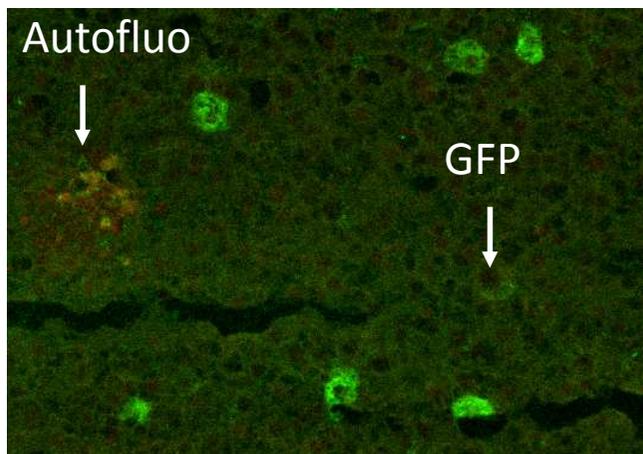
Émission 515 nm



Émission 570 nm



merge

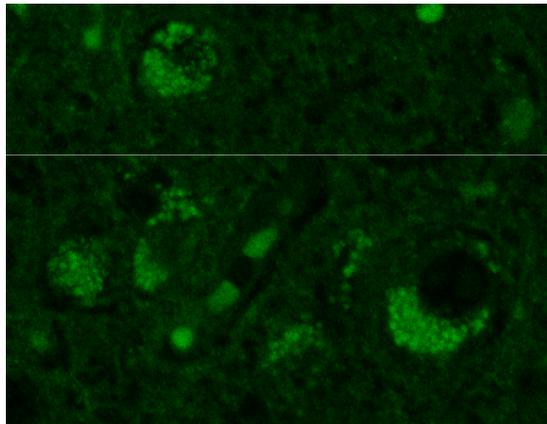


Expression de la GFP
dans les hépatocytes

Intérêts de la microscopie confocale en immunohistochimie

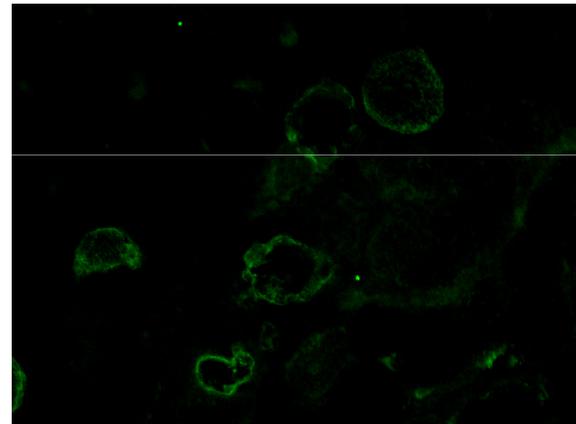
- Autres exemples de structures ou molécules autofluorescentes que l'on va pouvoir dissocier du signal spécifique

Coupe d'encéphale



Lipofuschine (granules fluorescents dans les neurones)

Coupe de muscle



Cellules musculaires calcifiées

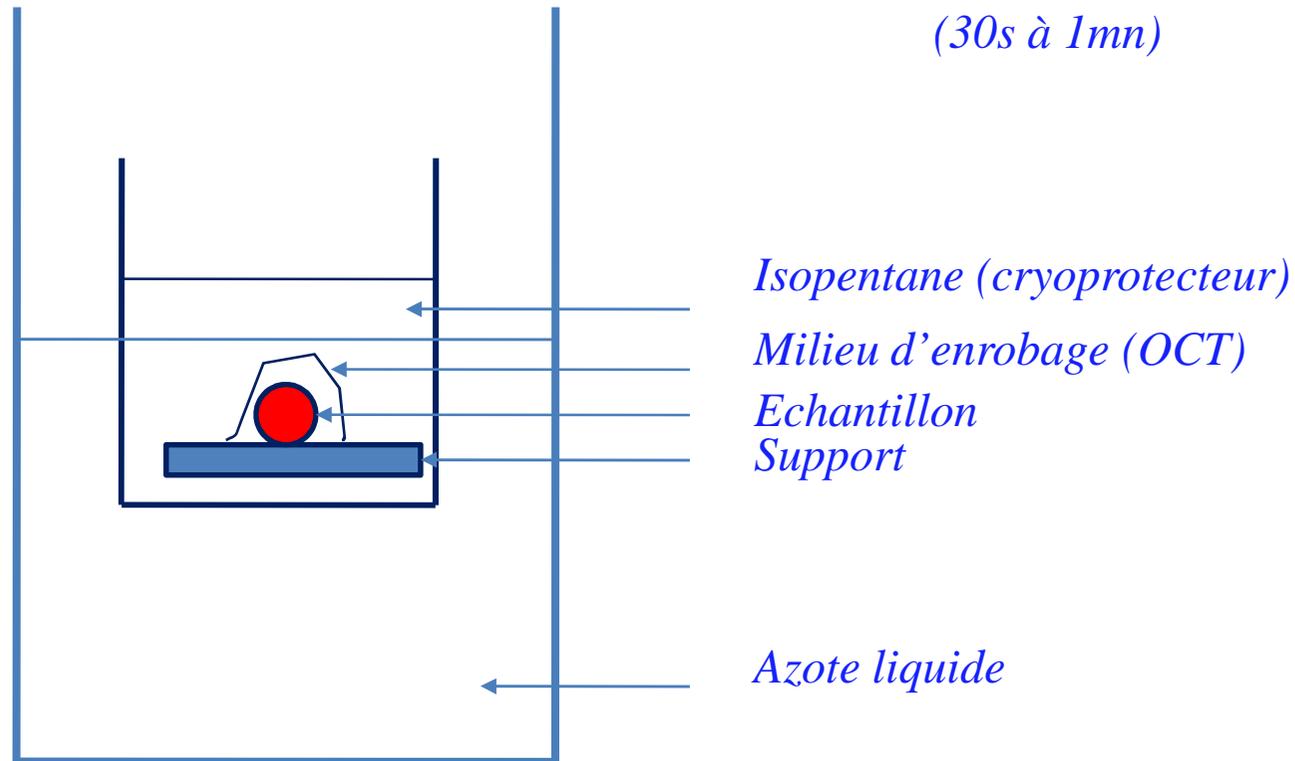
Matériel le plus approprié à la microscopie confocale

- **Coupes congelées : épaisseur de 8µm à 100µm**
 - pas de fixation préalable du tissu
 - pas de déshydratation , pas d'inclusion
- **Étapes qui peuvent être longues et engendrées des artefacts 'autofluorescence, mauvaise conservation des déterminants antigéniques'**

A noter que certains tissus ont besoin d'une pré-fixation avant la congélation:

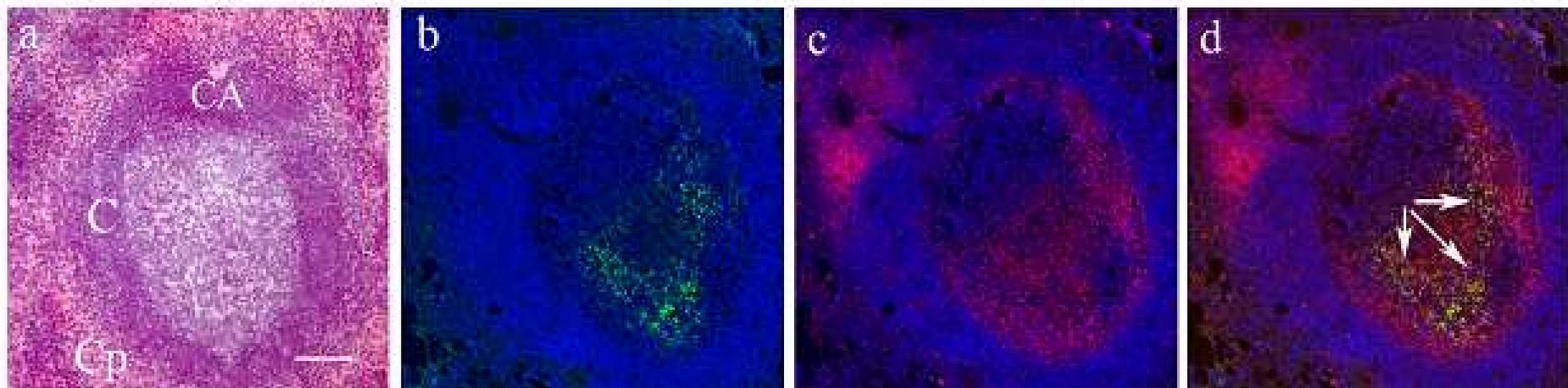
Système nerveux central (PFA 4%, sucrose pour préserver les structures)

Protocole classique de congélation des tissus animaux



Coupes à congélation

- Températures classiques de coupes à congélation (-20°C (foie, muscle) à -28°C (encéphale))
- Epaisseurs de coupes (8µm à 100µm)
 - coupes fines pour immunohistochimie (8µm à 10 µm)



H.E.S.

Vert (GFP)
Bleu (noyaux)

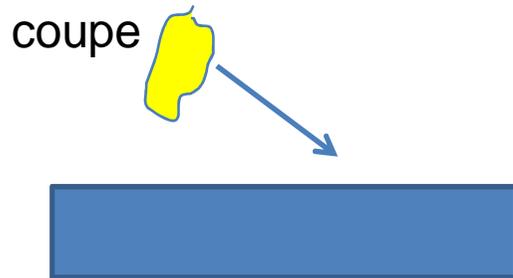
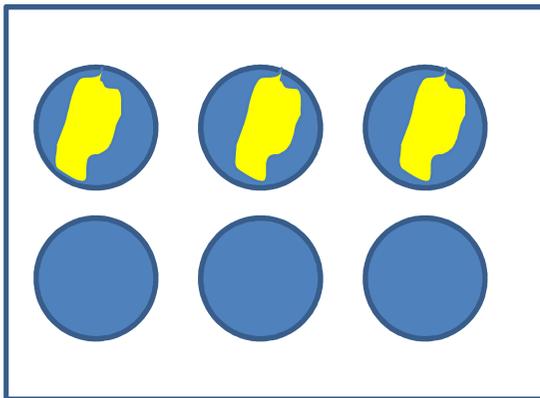
Rouge T CD4

Jaune GFP/CD4

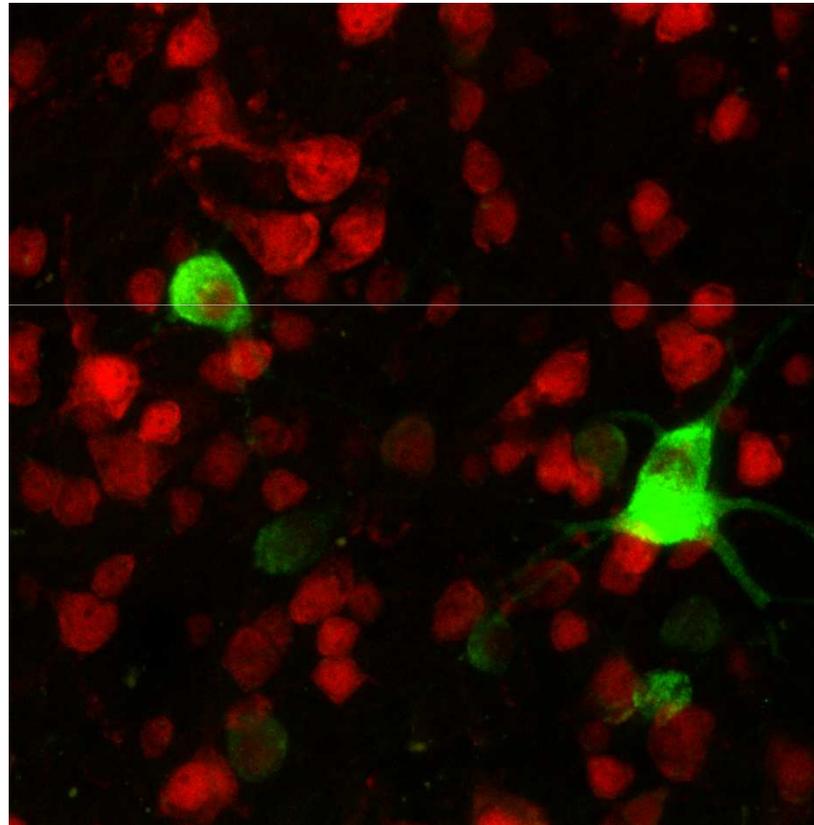
Coupes à congélation

- coupes semi-épaisses (coupes flottantes 30µm) pour un immunomarquage en profondeur

Immunomarquage réalisées dans des puits



Lame

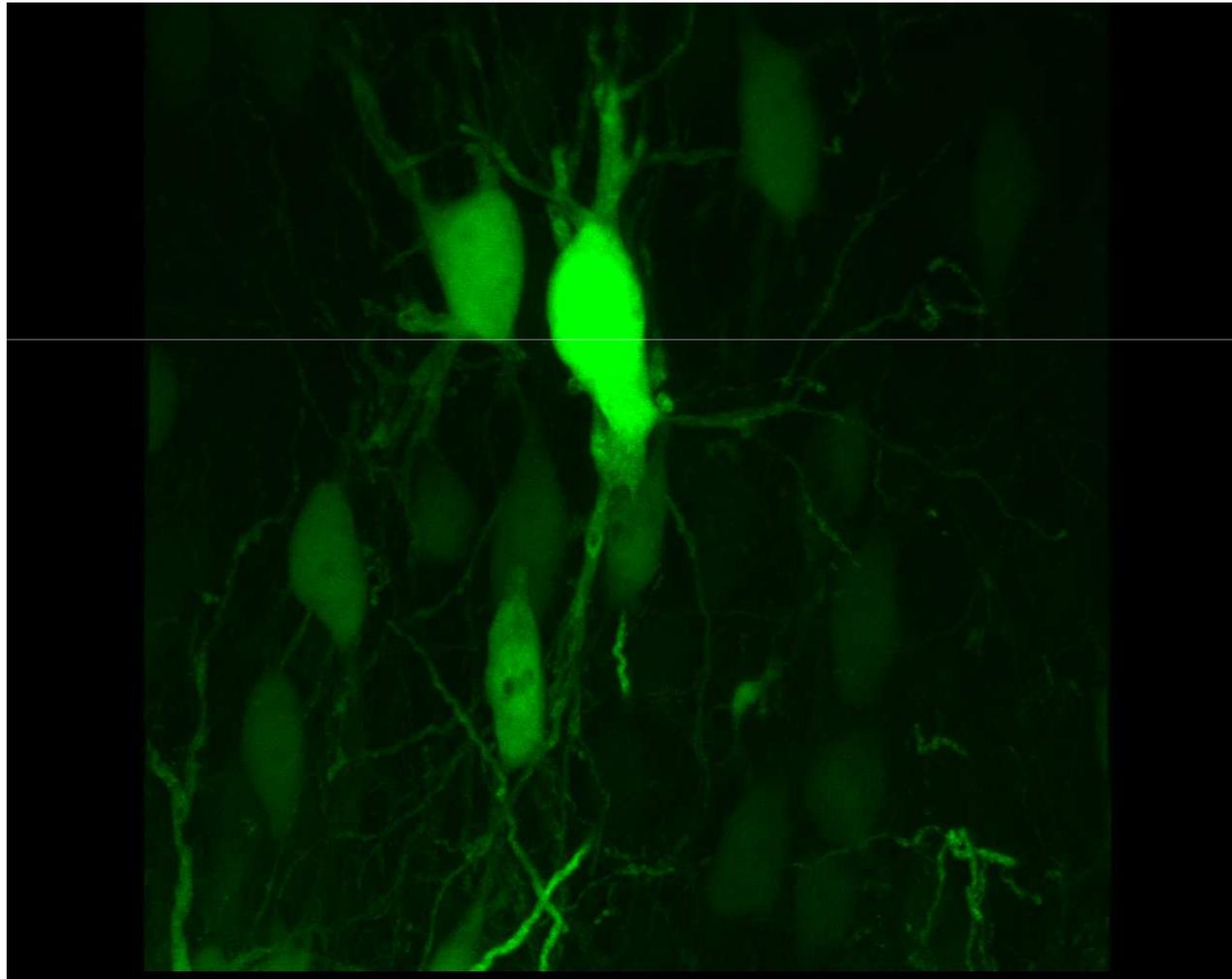


Neun (rouge)

HA (vert)

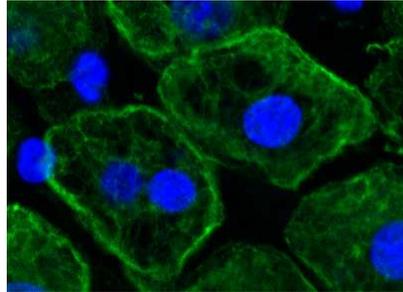
Coupes à congélation

- coupes épaisses (100 μ m) pour recherche d'un signal fluorescent exprimé *in situ* (ex : GFP), visualisation 3D

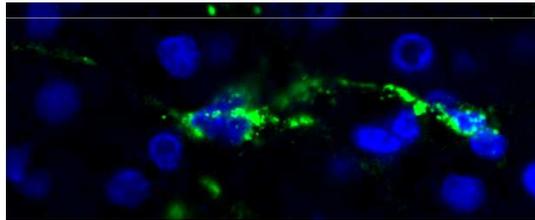


Fixation des coupes avant immunomarquage

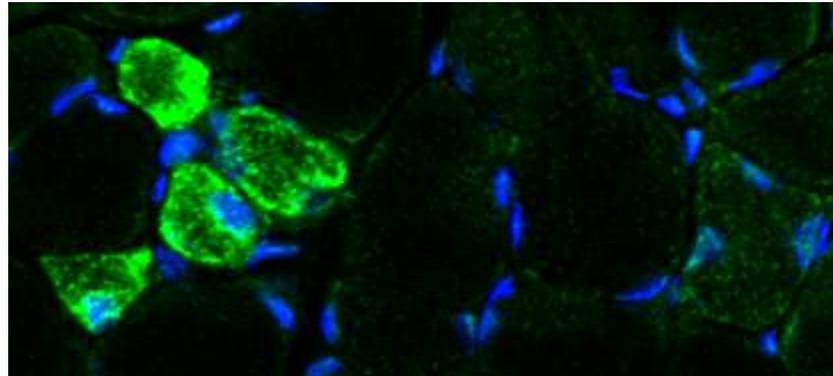
- Foie , immunomarquage de la cytokératine (CTK Dako M 821) , fixation PFA 4%, 10 mn T°A



- Foie, cellules endothéliales (FVIII Dako A0082), fixation acétone -20°C, 5 min.



- Muscle, protéine kinase (AKT1 pharmingen), fixation acétone/méthanol - 20°C, 5 min.

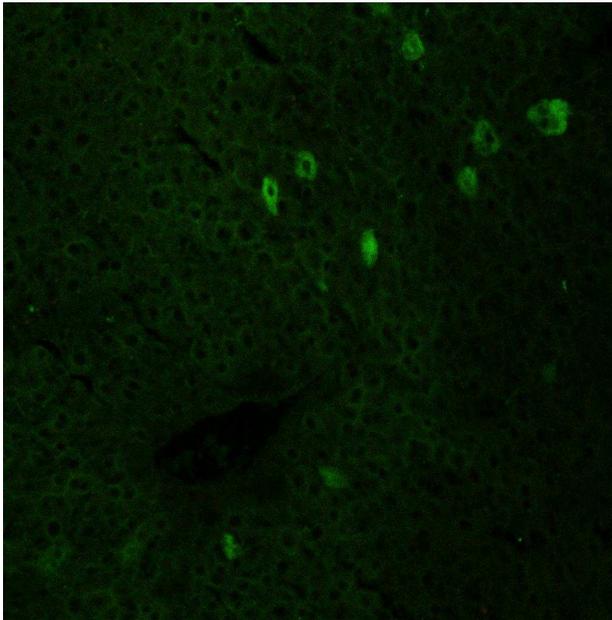


Fixation des coupes avant immunomarquage

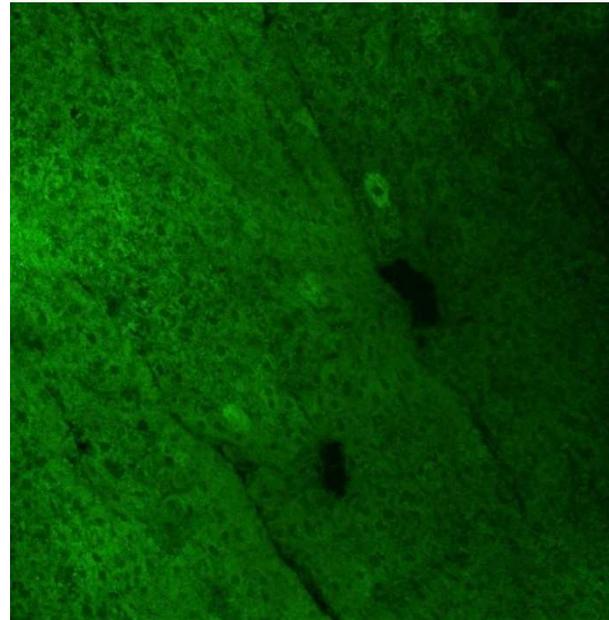
- **Artefacts dus à la fixation**

Exemple : augmentation de l'autofluorescence en présence de PFA

Sans fixation PFA



Après fixation PFA

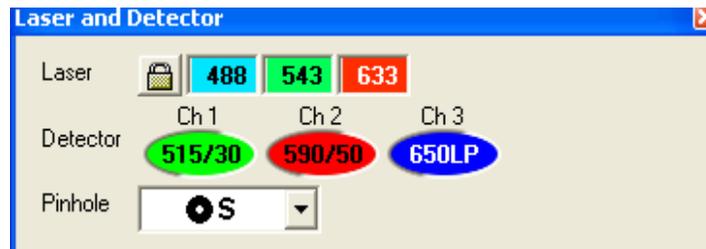


Expression de la GFP dans les hépatocytes

Choix des sondes fluorescentes

- **Suivant le microscope confocale à disposition**

Nikon C1 , 3 lasers 488nm, 543 nm et 633 nm



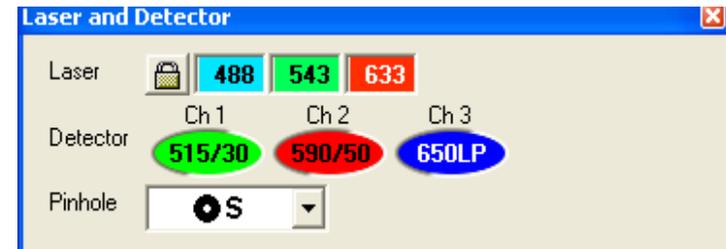
- **Suivant l'autofluorescence du tissu**

Exemple : Si autofluorescence plus marquée dans le vert (em 515/30) que dans le rouge (550/590) utiliser un alexa 555 ou un alexa 633

- **Suivant la nature d'une sonde fluorescente déjà présente dans le tissu**

Exemple : Si GFP *in situ*, utiliser les sondes alexa 555 et alexa 633 pour un immunomarquage.

Choix des sondes fluorescentes



	EXCITATION	EMISSION	Molécules marquées
IODURE DE PROPIDIUM	470 nm	615 nm	ADN
TOPRO3	633 nm	665 nm	ADN
FITC	490 nm	520 nm	Anticorps ou streptavidine
ALEXA FLUOR 488	495 nm	519 nm	Anticorps ou streptavidine
ALEXA FLUOR 555	555 nm	565 nm	Anticorps ou streptavidine
ALEXA FLUOR 633	632 nm	647 nm	Anticorps ou streptavidine
CYANINE 3	488 nm 552 nm	570 nm	Anticorps ou streptavidine
eGFP	488 nm	509 nm	Green fluorescent protein

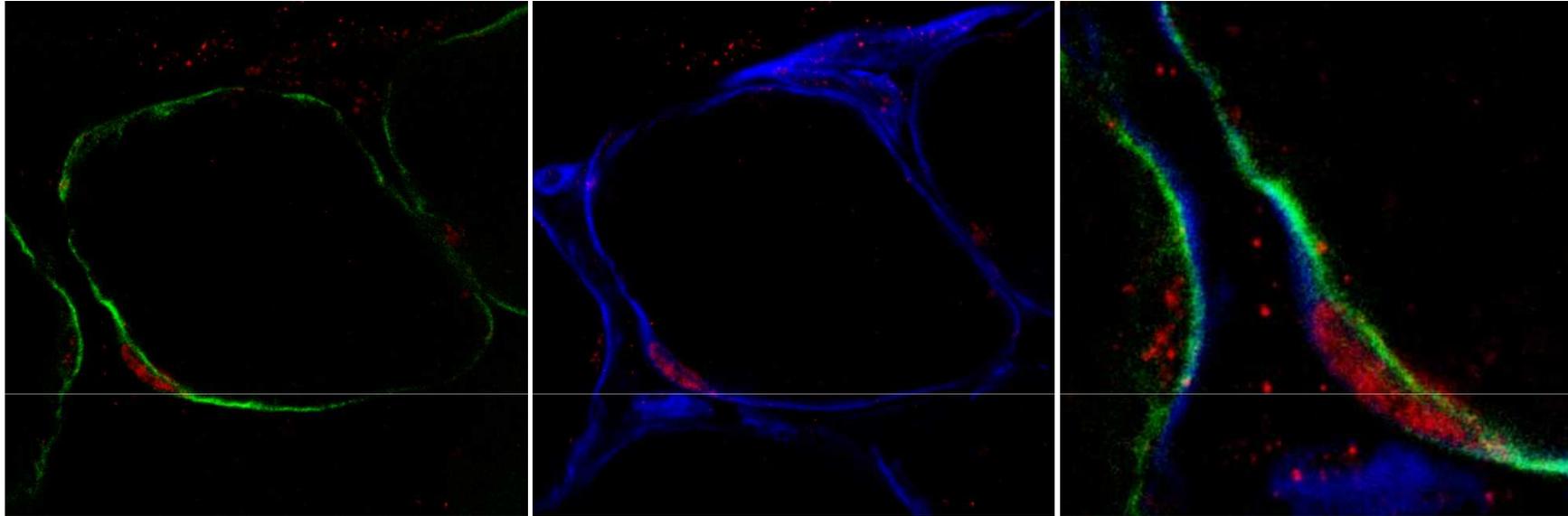
Milieux de montage

- **Fluorescent mounting medium** ref source commerciale Dakocytomation, préservation de la Fluorescence. Stockage 4°C à l'abri de la lumière. Sèche.
- **Vectashield mounting medium** for fluorescence ref H-1000 source commerciale Biovalley, milieu de montage qui ne sèche pas. Préserve la fluorescence. 4°C à l'abri de la lumière.
- **Vectashield mounting medium with Dapi** (emission 456 nm)ref H-1200. Mêmes propriétés que vectashield seul. Mais milieu contient du Dapi qui permet de marquer l'ADN.
- **Vectashield mounting medium with propidium iodide**, permet de marquer ADN (emission 615 nm)
- **Prolong anti-fade kit** ref source commerciale molecular probe : préservation de la fluorescence. Stockage -20°C, à l'abri de la lumière. Sèche.
- **Mowiol** ref source commerciale Calbiochem, composition Mowiol, glycérol, eau. Milieu de montage permettant de préserver la fluorescence, agent anti-fading. Stockage à 4°C après reconstitution, -20°C à long terme. Sèche.

Conseiller de luter avec du vernis à ongle pour éviter la formation de poches d'air au cours du stockage des lames.

Exemple : triple immunomarquage sur coupe congelée de muscle

Objectif : localisation des noyaux β gal en position satellite dans la fibre musculaire



Sarcolemme (vert)

Lame basale (bleu)

*Noyau β Gal (rouge) entre la
lame basale et le sarcolemme*

*Ac Iaire monoclonal souris
Ac IIaire goat anti mouse
alexafluor488*

*Ac Iaire polyclonal de lapin
Ac IIaire goat anti rabbit
alexafluor633*

*Ac Iaire polyclonal de lapin
très dilué
Système amplification
Streptavidine alexafluor555*