



Préparation des échantillons pour l'immunofluorescence

Application à la microscopie confocale

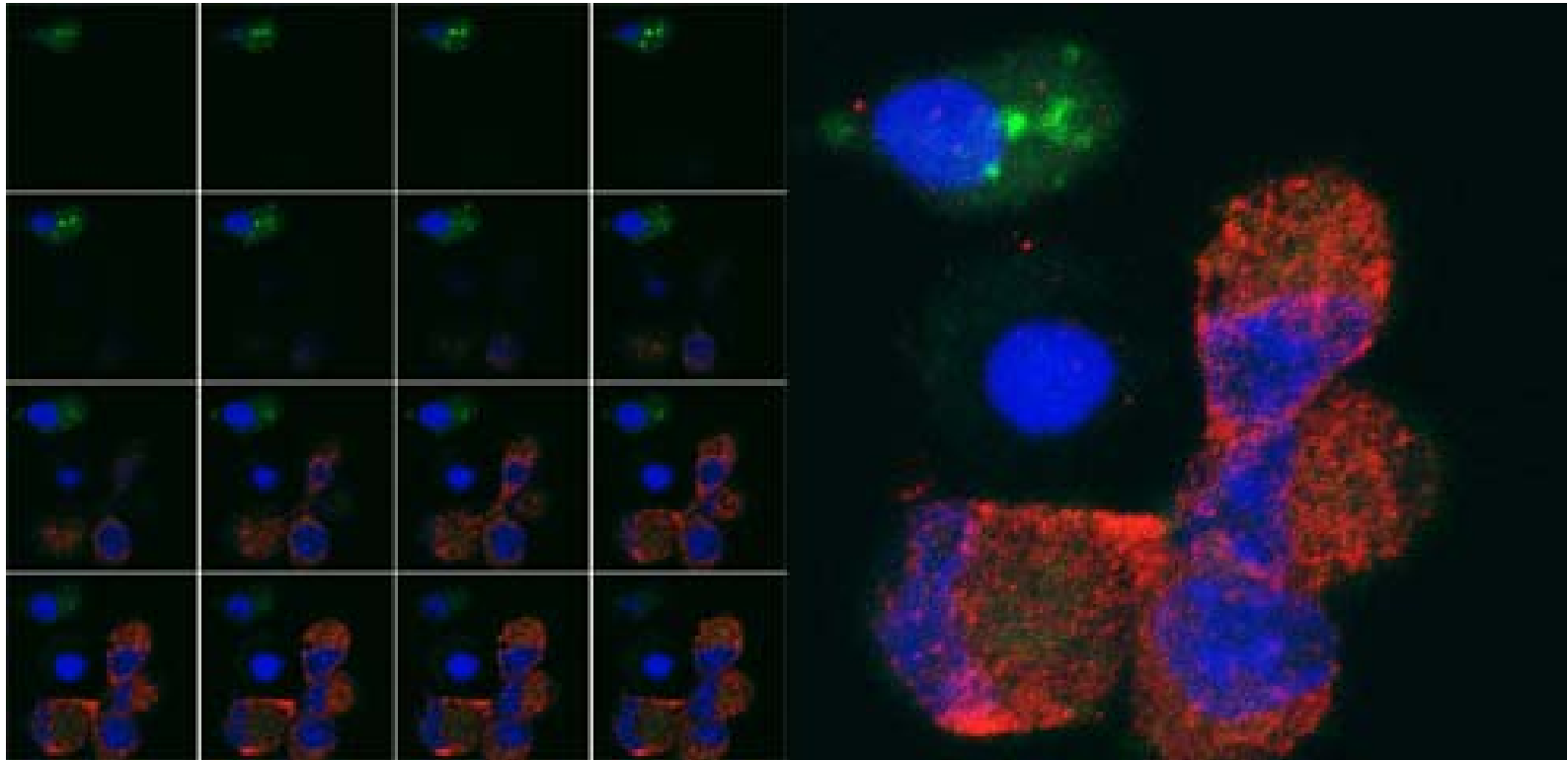
Microscopie confocale : Principe et Pratique
Formation permanente INSERM – ADR Grand Ouest
19–22 mai 2008

Dr. Caroline COLOMBEIX
Responsable du Plateau technique
« Imagerie Cellulaire et Vidéomicroscopie »
INSERM IFR26, Nantes

Dr. Laurence DUBREIL
Responsable Microscopie confocale
UMR 703 INRA
Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Pourquoi une préparation spécifique ?

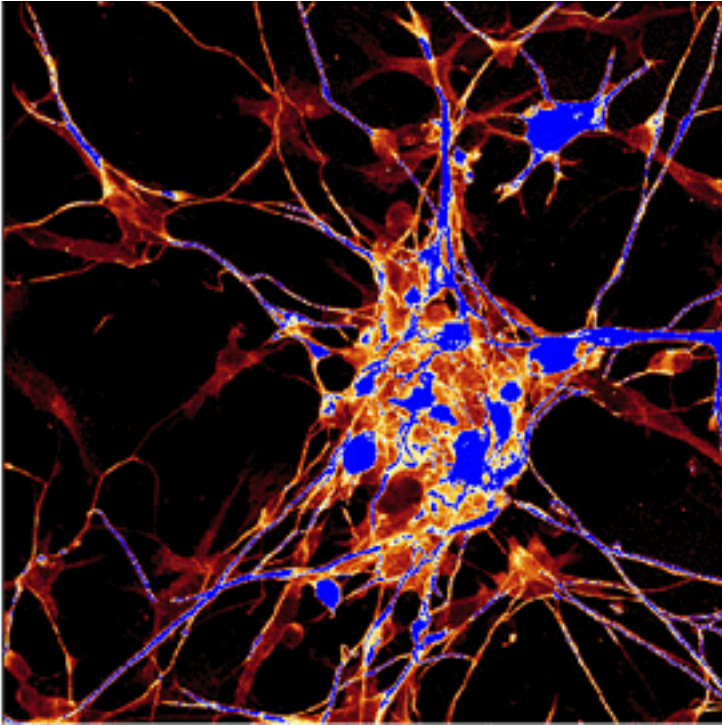
Microscopie confocale = Acquisition de coupes optiques s riees



➤ Techniques de préparation différentes des protocoles d'immunofluorescence classique (aplatissent les préparations)

Pourquoi une préparation spécifique ?

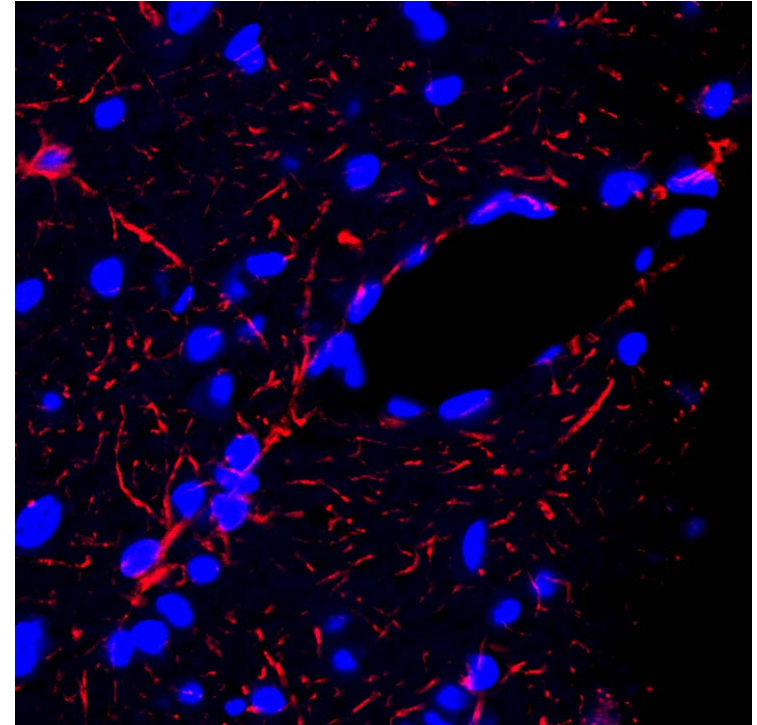
Immunocytologie



Immunomarquage de la GFAP sur des astrocytes en culture

Caroline COLOMBEIX

Immunohistologie



Immunomarquage de la GFAP sur coupe tissulaire d'encephale canin

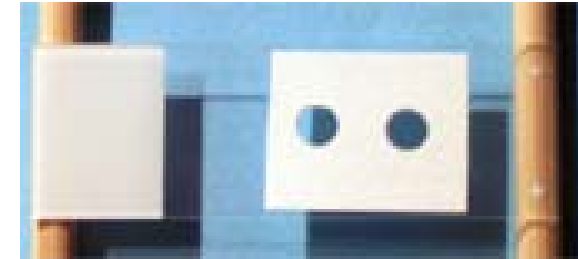
Laurence DUBREIL

Préparation des cellules en culture

Nature des cellules et supports

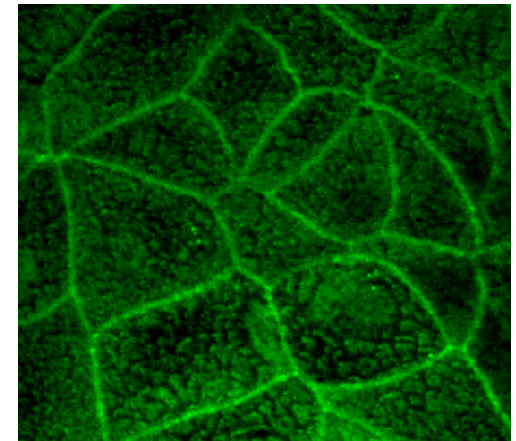
Cellules non adhérentes :
les immobiliser sur le support

- Cytocentrifugation (cytospin) : à proscrire car perte 3D et localisation des organites intracellulaires artéfactuelle
- Utilisation support comme gélatine ou polylysine sur lamelle 0,17 μm
- Dépôt par capillarité



Cellules adhérentes :
culture sur support verre (plastique = autofluorescence)

- Lamelle 0,17 μm puis montage sur lame porte-objet
- LabTeck ou boîte pétri fond verre 0,17 μm (time-lapse) (ex : [MatTek Corporation, Ashland MA, USA](#))
- Culture sur filtres (cellules polarisées)



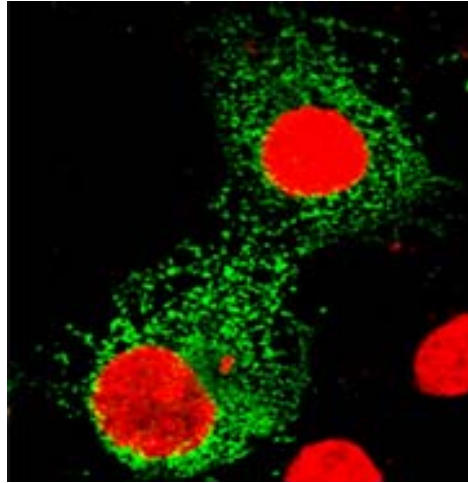
Marquage de la villine sur une lignée cellulaire colique

S. Kermorgant, INSERM U 410

Marqueurs Fluorescents

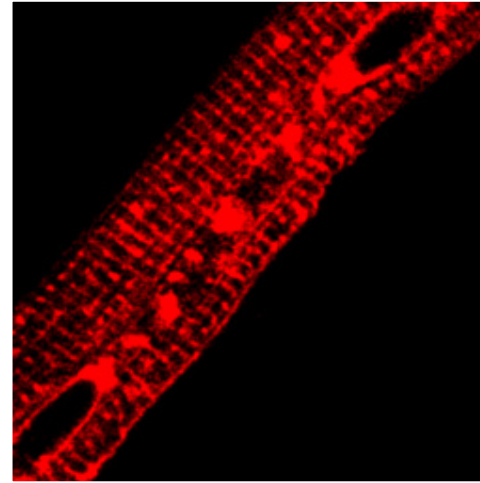
Protéines chimères GFP

Lignée cellulaire
rénale transfectée



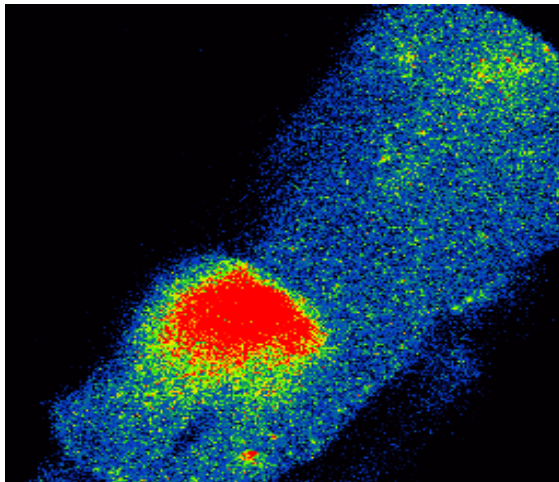
Colorants spécifiques d'organelles

Cardiomyocyte isolé
DID : membranes



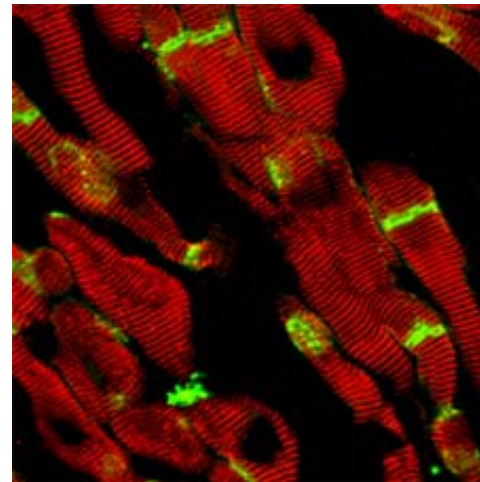
Marqueurs d'activité biologique

Cardiomyocyte isolé
Fluo-4 : Activité Ca²⁺



Immunomarquage

Cardiomyocytes
coupe de coeur
Marquage des
connexines (vert)
et de l' α actinine
(rouge)

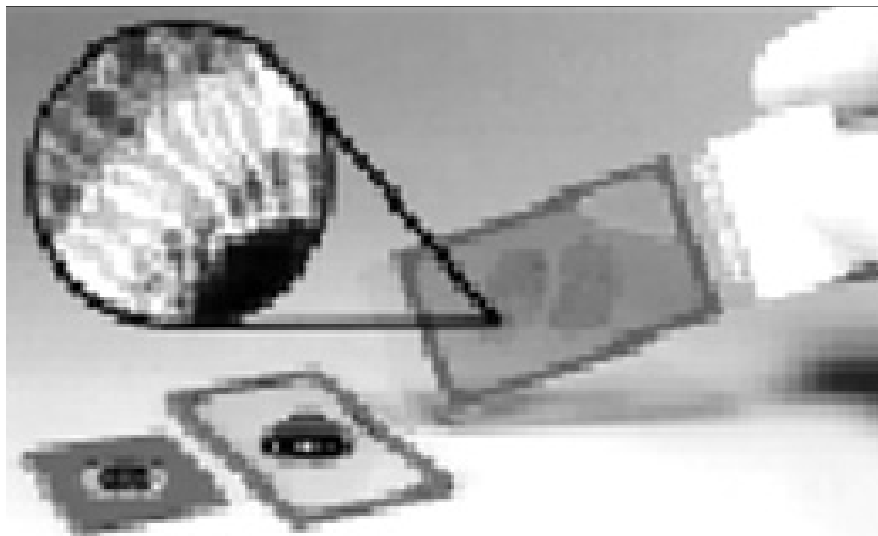


Immunomarquage

Principe

Immunomarquage:

Utilisation d'un anticorps spécifique de la molécule d'intérêt couplé à un fluorochrome, directement ou par l'intermédiaire d'un réactif secondaire.



Immunomarquage

6 étapes majeures

Fixation



Saturation sites
non spécifiques
Protéines : BSA,
ovalbumine, sérum



Contre-coloration



Perméabilisation
Détergents : Triton,
saponine, SDS



Anticorps spécifiques



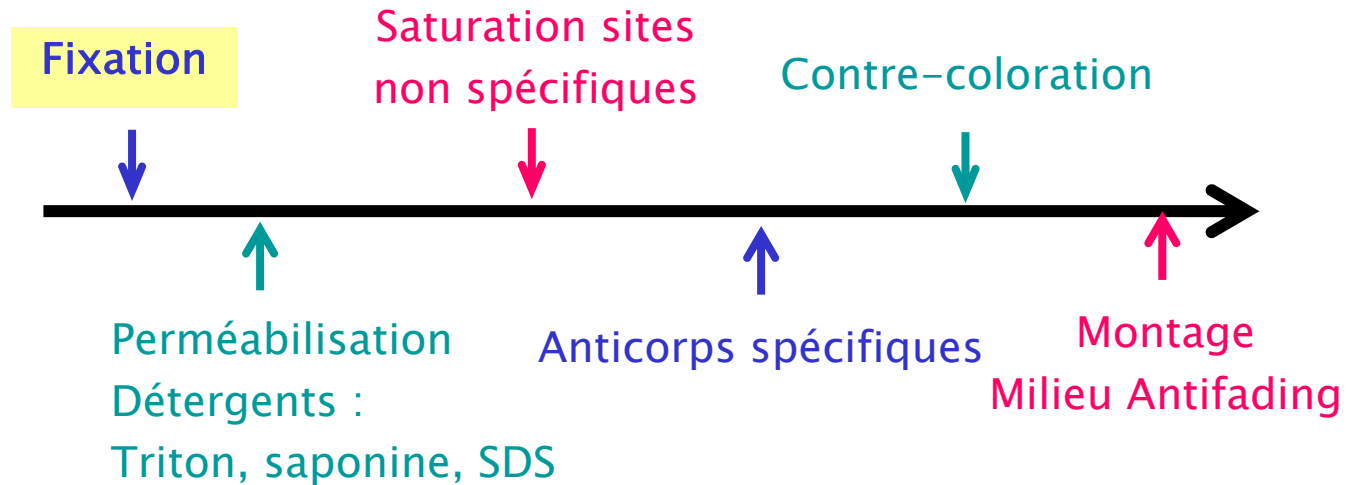
Montage
Milieu Antifading



Travail en chambre humide
Ne jamais laisser sécher l'échantillon



Fixation Principe



- Conservation des structures : **Pontage des protéines**
- Immobilisation **rapide** et homogène des antigènes d'intérêt
- Respect de la nature de l'échantillon : **osmolarité et concentration ionique**
- Conservation et amplification de la fluorescence spécifique

Choix du fixateur

Fixateurs aldéhydiques

Fixateurs coagulants

Glutaraldéhyde

Paraformaldéhyde

Méthanol, Ethanol
Acétone

+

-

Réticulation

Conservation structure 3D

Immunomarquage
Accessibilité intracellulaire

Immunomarquage

6 étapes majeures

Fixation



Saturation sites
non spécifiques
Protéines : BSA,
ovalbumine, sérum



Contre-coloration



Perméabilisation
Détergents : Triton,
saponine, SDS



Anticorps spécifiques

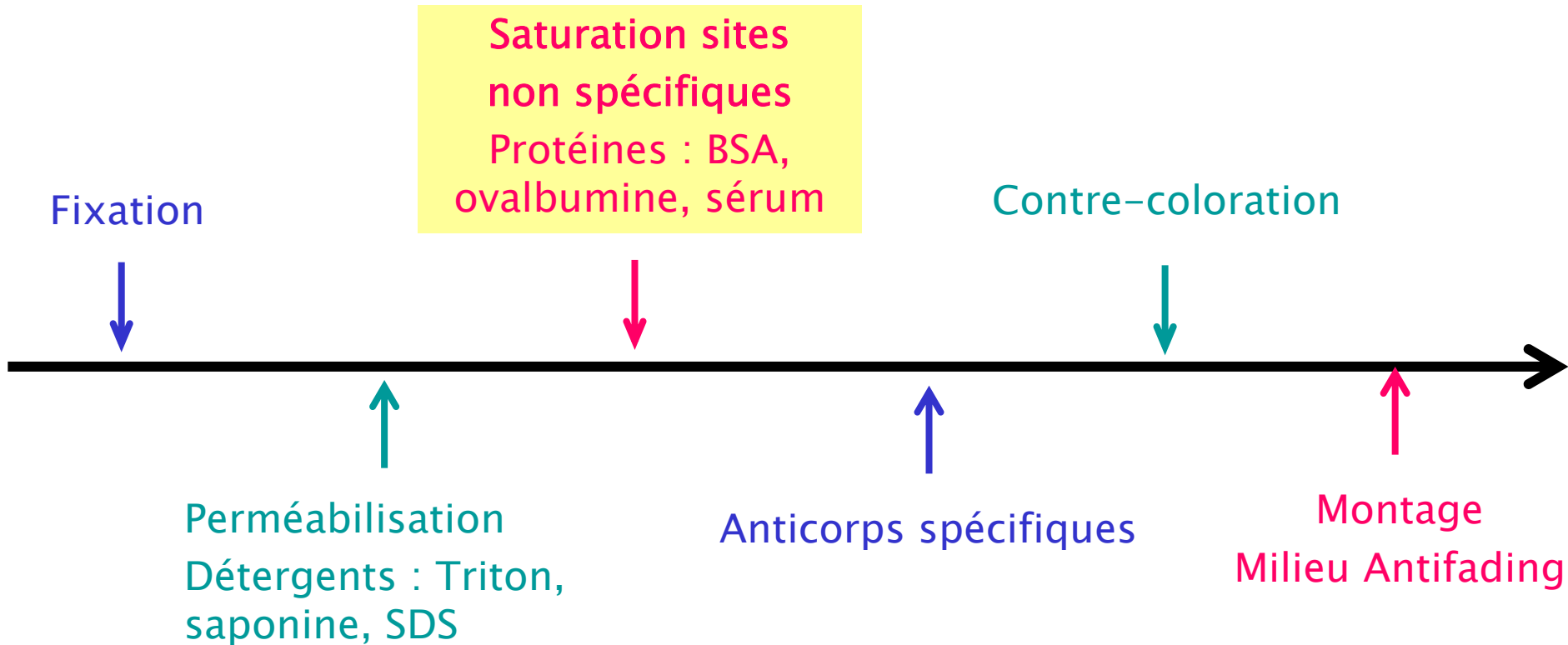


Montage
Milieu Antifading



Immunomarquage

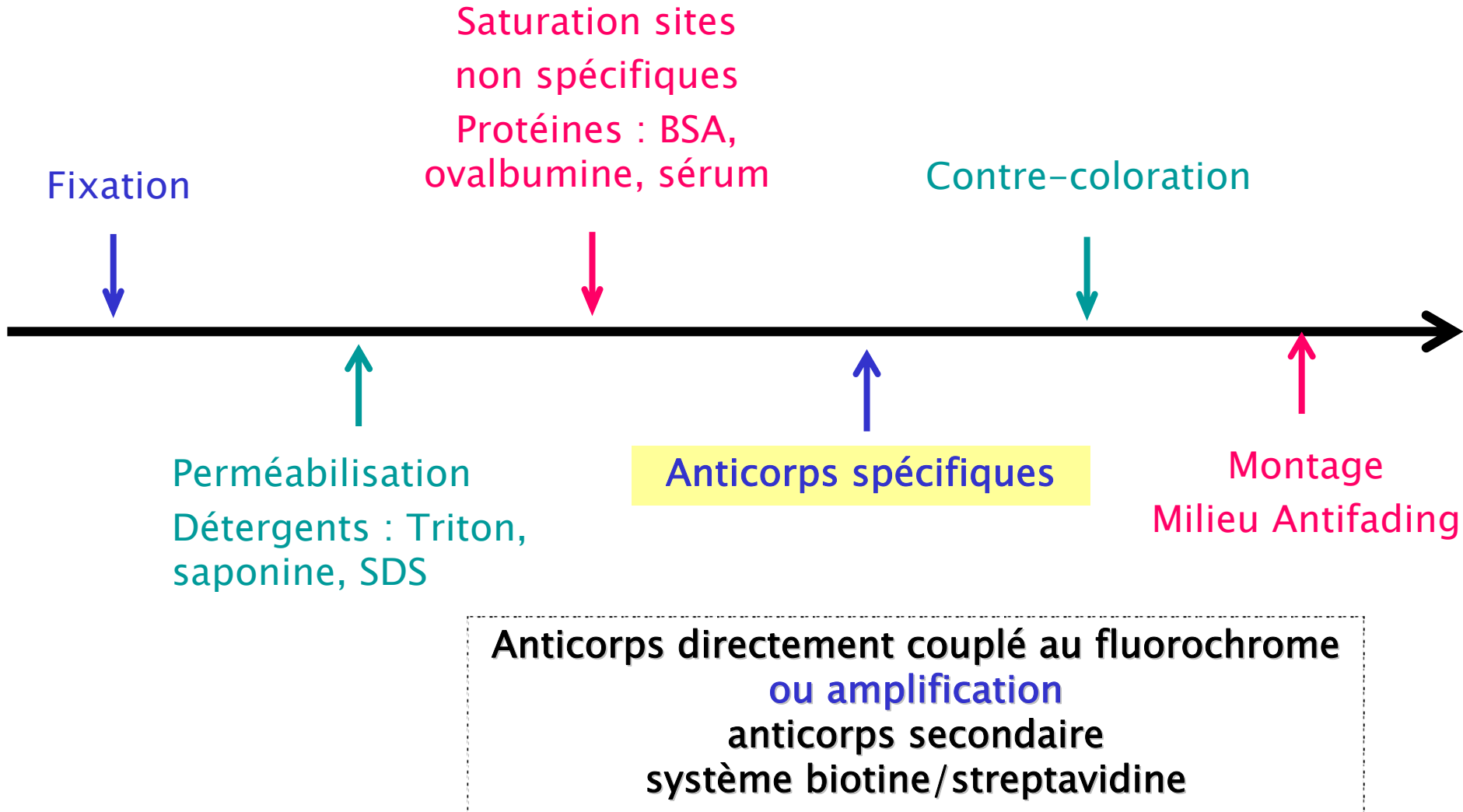
6 étapes majeures



Sérum de la même espèce
que l'échantillon
ou l'anticorps secondaire marqué

Immunomarquage

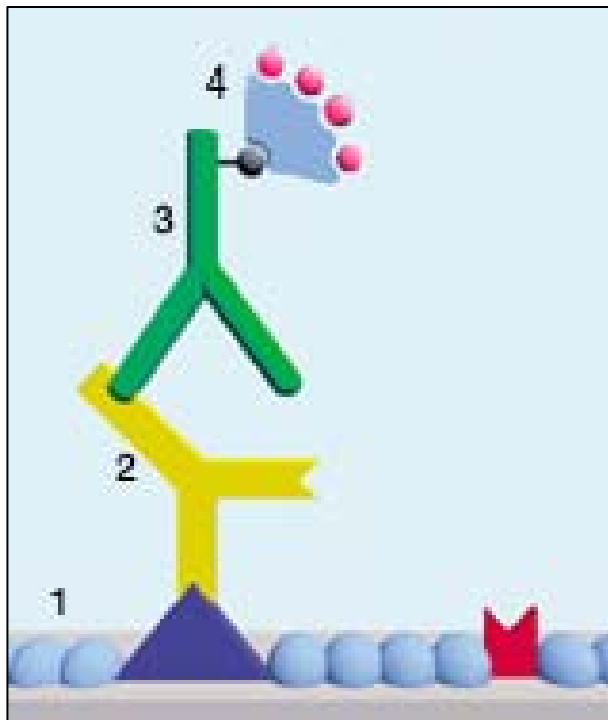
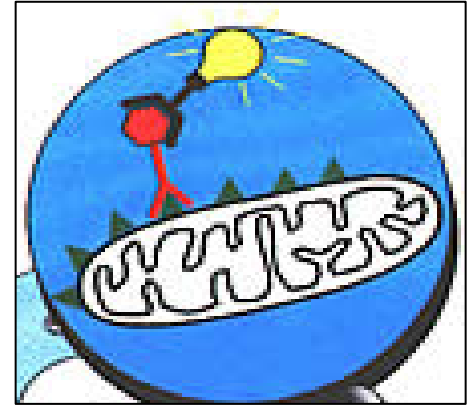
6 étapes majeures



Immunomarquage

Méthodes d'amplification

Anticorps secondaire
marqué par le fluorochrome



systeme biotine/streptavidine

Ex: marquage de l'antigène CD3

- ① Antigène CD3
- ② Anticorps de lapin anti-CD3
- ③ Anticorps anti-lapin biotinylé
- ④ Streptavidine couplée au Rouge Texas

Immunomarquage

cas du double-marquage

➤ Utiliser de préférence des anticorps provenant d'espèces différentes

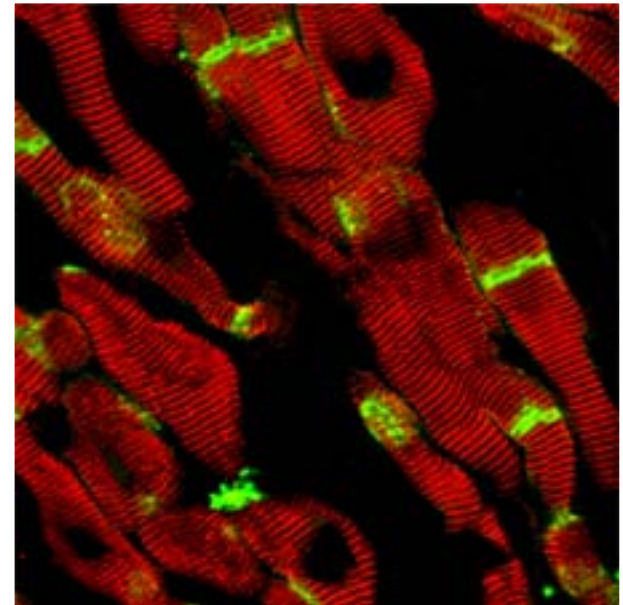
sinon :

➤ Incuber séquentiellement

➤ Saturer de nouveau en BSA ou sérum avant la deuxième incubation

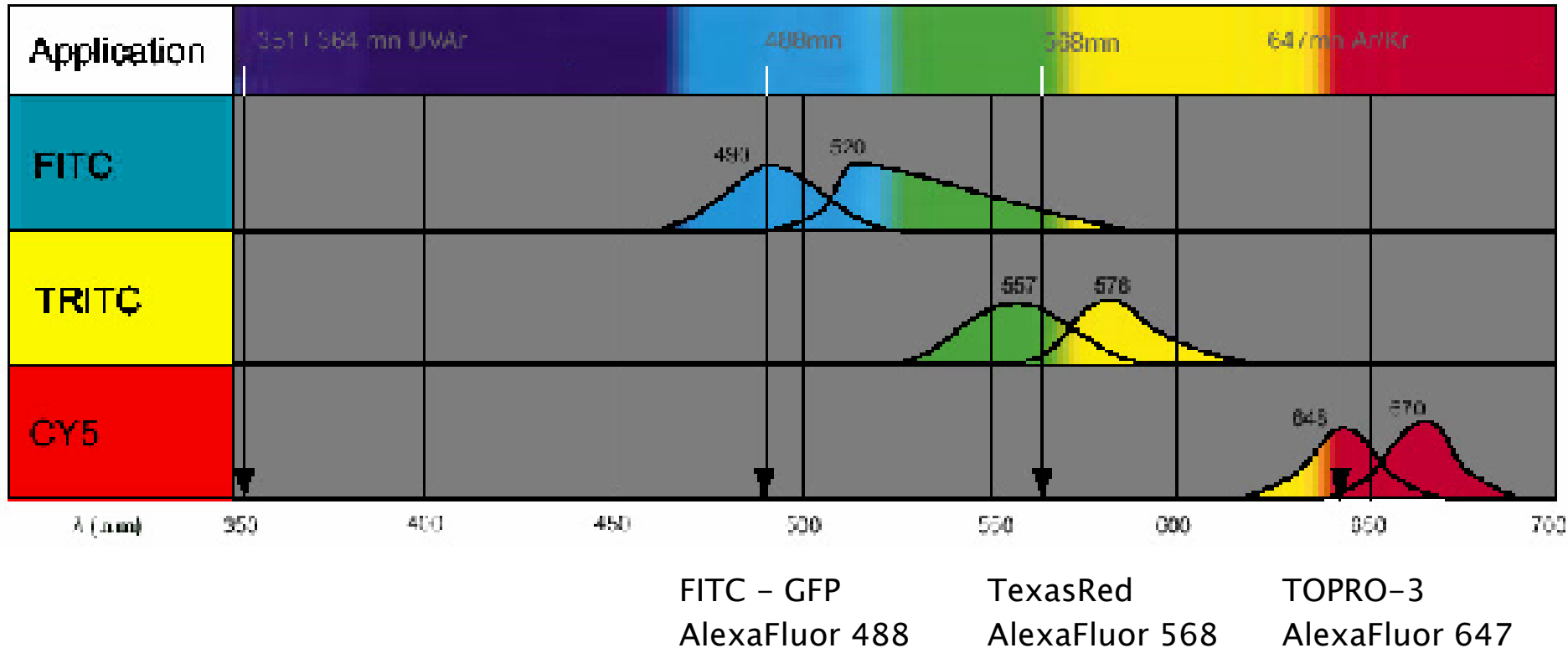
➤ Faire une lame avec chacun des anticorps séparément pour vérifier leur spécificité

Marquage des connexines (en vert)
et de l' α actinine (en rouge) sur
une coupe de coeur humain



Choix des fluorochromes

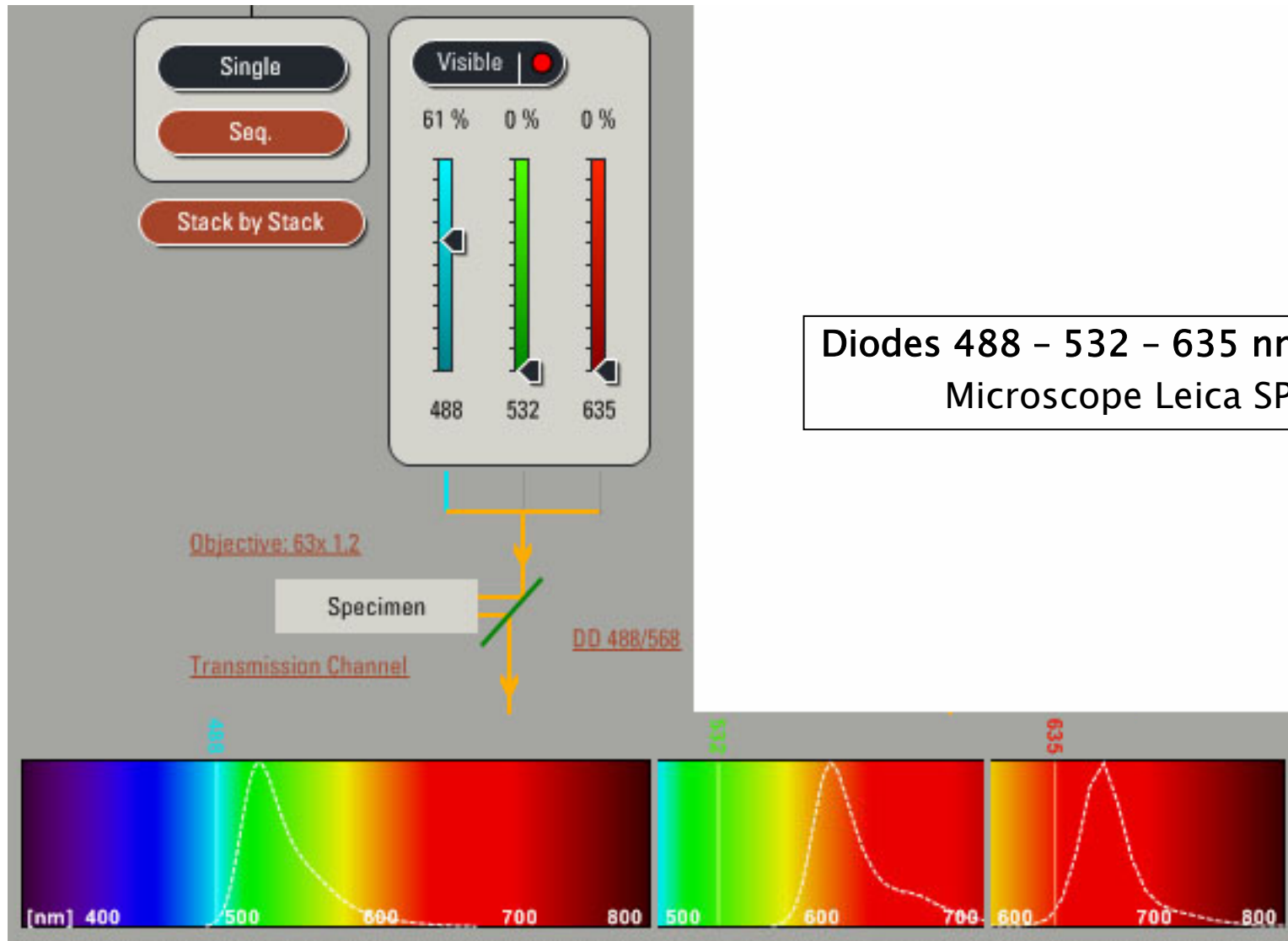
En fonction de son système d'acquisition



Laser Argon/Krypton
 Microscope Leica TCS SP1

Choix des fluorochromes

En fonction de son système d'acquisition



Diodes 488 - 532 - 635 nm
Microscope Leica SPE

FITC - GFP
AlexaFluor 488

TexasRed
AlexaFluor 532

TOPRO-3
AlexaFluor 635

Immunomarquage

6 étapes majeures

Fixation



Saturation sites
non spécifiques



Contre-coloration



Perméabilisation



Anticorps spécifiques



Montage
Milieu Antifading

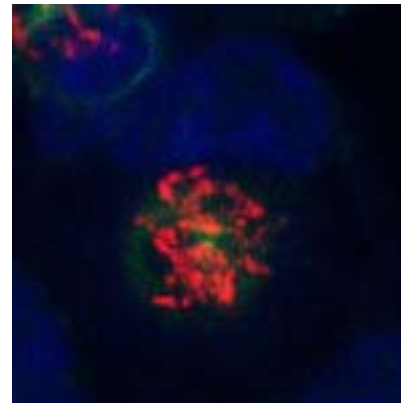


Ne pas écraser la préparation :

Utiliser des petits « spacers »
(scotch double face)

**Milieu de montage polymérisant
et antifading**

(ex: Prolong, Molecular Probes –
Invitrogen, Cergy Pontoise France)



ANNEXE 1

IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES ADHÉRENTES

Suivant Caroline COLOMBELX, IFR26, Nantes

- Les cellules sont cultivées sur lamelle, en plaque 24 puits
- 3 lavages PBS afin d'éliminer tout le milieu de culture
- **Fixation** : PBS - PFA 4% 200 µl par puit (2 ml)
- 30 min, RT, Chambre humide
- 3 lavages PBS en bain de 5 min, sous agitation douce
(*Aspiration du PBS avec trompe à vide*)
- **Perméabilisation** : PBS - 0.2 % TWEEEN 20
- 15 min - 37 °C - Chambre humide
- 3 lavages PBS
- **Saturation** :
 - PBS - 3% BSA - 1 µg/ml Ig souris
 - 30 min, RT, Chambre humide
 - *Pas de lavage*
- **Ac primaire** : dilution en PBS - 3% BSA
- 1 h, RT, Chambre humide
- 3 lavages PBS
- **Ac secondaire** : dilution en PBS - 3% BSA
- 30 min, RT, Chambre humide
- 3 lavages PBS
- **Extravidine-FITC** : dilution en PBS - 3% BSA
- 30 min, RT, Chambre humide
- 3 lavages PBS
- **Marquage du noyau par TOPRO-3**
- 3 lavages PBS
- **Montage en Prolong Antifade Kit**

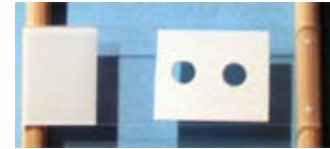
ANNEXE 2

IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES NON ADHÉRENTES

Suivant Caroline COLOMBEIX, IFR26, Nantes

Dépôt cellules : 300 000 dans 15 μ l PBS par spot

- Nettoyer spot avec poire lavement
- Dépôt 15 μ l
- **Laisser sécher 30 min, RT, boîte avec couvercle, 1 seule couche cellules**



Enlever papier Wattman

Entourer par DAKOPEN

-
- **Fixation** : PBS - PFA 4% 50 μ l par spot
30 min, RT, Chambre humide
 - **Ag secondaire** : dilution en PBS - 3% BSA
30 min, RT, Chambre humide
3 lavages PBS
 - **Perméabilisation** : PBS - 0.2% TWEEN 20
15 min - 37 °C - Chambre humide
3 lavages PBS
 - **Extravidine-FTTC** : dilution en PBS - 3% BSA
30 min, RT, Chambre humide
3 lavages PBS
 - **Saturation** :
PBS - 3% BSA - 1 μ g/ml Ig souris
30 min, RT, Chambre humide
Pas de lavages
 - **Marquage du noyau par TOPRO-3**
3 lavages PBS
 - **Ag primaire** : dilution en PBS - 3% BSA
1 h, RT, Chambre humide
3 lavages PBS
 - **Montage en Prolong Antifade Kit**
-