



HAL
open science

Fascicule Formation à la Microscopie Corrélative - ANF CNRS-INRAE

Christine Péchoux, Claire Boulogne

► **To cite this version:**

Christine Péchoux, Claire Boulogne. Fascicule Formation à la Microscopie Corrélative - ANF CNRS-INRAE. École thématique. Applications de la microscopie corrélative à la biologie Cellulaire, Jouy-en-Josas (FR), France. 2021, pp.12. hal-04569717

HAL Id: hal-04569717

<https://hal.inrae.fr/hal-04569717>

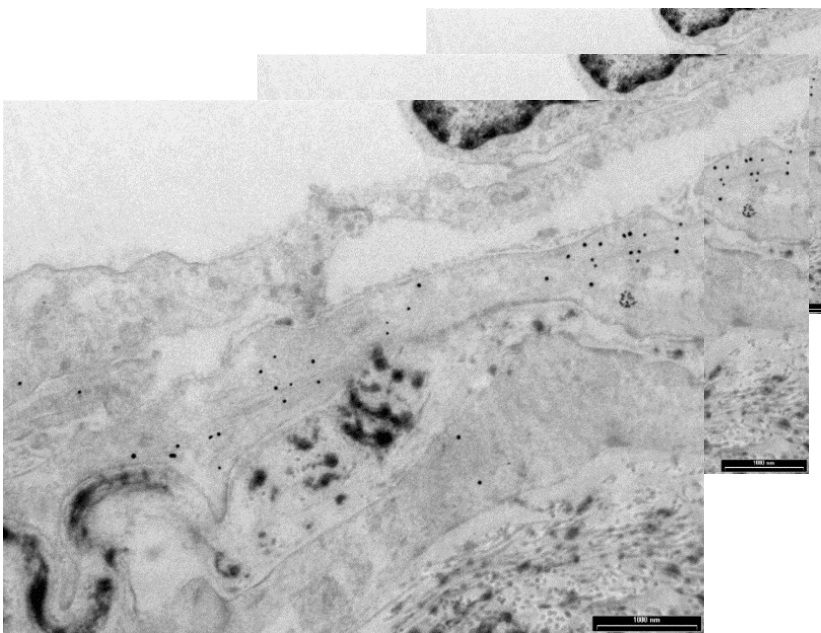
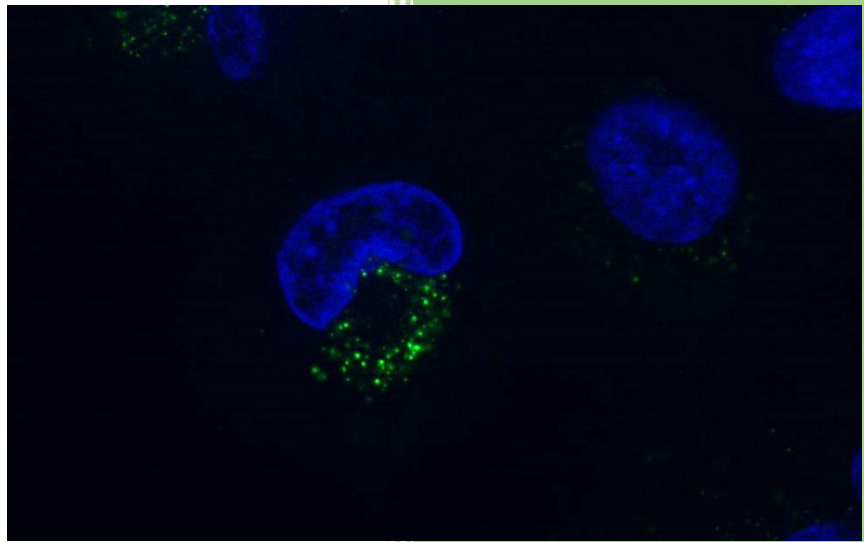
Submitted on 6 May 2024

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.

Public Domain

ANF CNRS- INRAE



ANF CNRS- INRAE-1^{er} Octobre 2021

INRAE Jouy-en-Josas

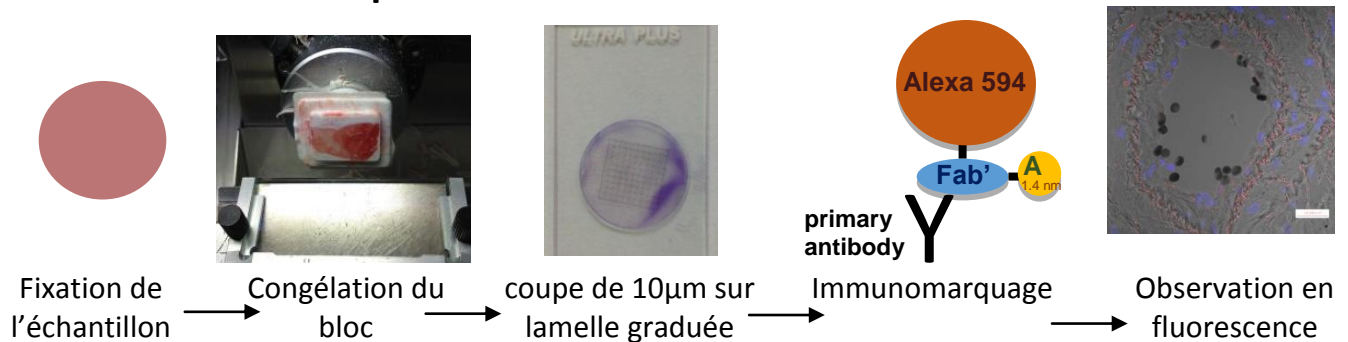
ATELIER 1

**LOCALISATION DE L'ACTINE MUSCULAIRE
LISSE DANS LA GLANDE MAMMAIRE DE
LAPINE EN GESTATION (G14)**

PROTOCOLE

Etape I : Préparation des échantillons en vue de l'immunofluorescence

Résumé de l'étape 1



Etape Fixation – inclusion OCT - Congélation

Prélèvement du tissu

Rinçage rapide en PBS/PO4

Immerger les échantillons de 4-5 mm³ (maximum) avec le mélange de fixation : paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,025%, en tampon phosphate 0.1M.

→ 1h à TA

Passer en paraformaldéhyde 4% seul, en tampon phosphate 0.1M, pendant 1h à TA.

+ ON à 4°C

Rinçage : 3 fois 15 min tampon phosphate 0.1M.

Puis imprégnation en tampon sucrose : graduellement 10%/ 2x 40% à +4°C et sous agitation

Eliminer le maximum de saccharose sur un papier filtre, enrober dans du milieu d'enrobage OCT ou autre et congeler -80°C sur une plaque de métal.

Transférer dans des moules et conserver à -80°C.

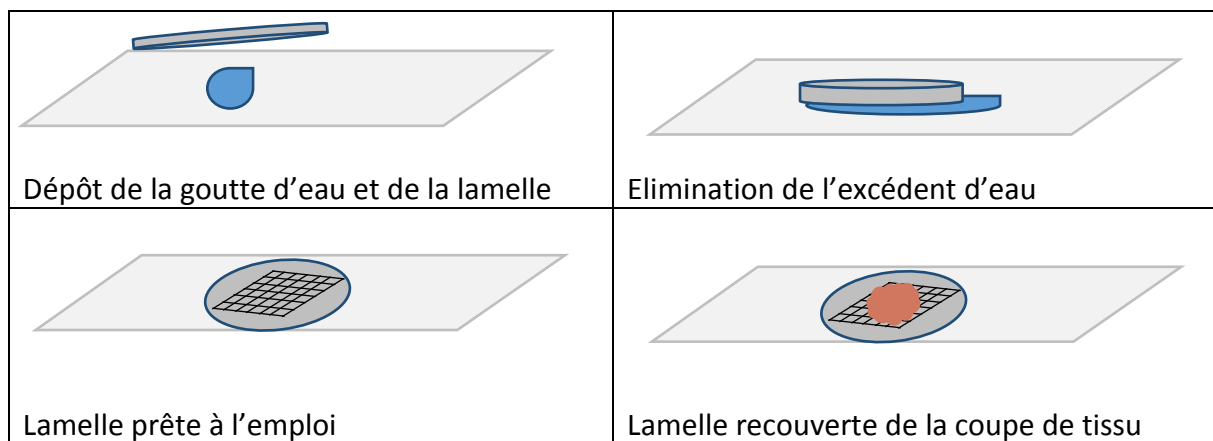


Etape coupes cryostat – Immunofluorescence – acquisition images

1- Coupes cryostat

Réaliser des coupes cryostat : la température dépend du tissu, sa dureté, son contenu en lipides.... Donc entre -20°C et -40°C

Les coupes d'au moins 10µm sont récupérées directement sur les lamelles corrélatives. Pour plus de praticité ces dernières sont maintenues par une goutte d'eau sur une lame de verre



Astuce : les lamelles peuvent être ensuite maintenues sur la lame par une goutte de vernis

Les coupes de tissus peuvent être conservées à -80°C dans une boîte plastique pour lame et contenant du silicagel pour limiter l'humidité et fermées avec un scotch.

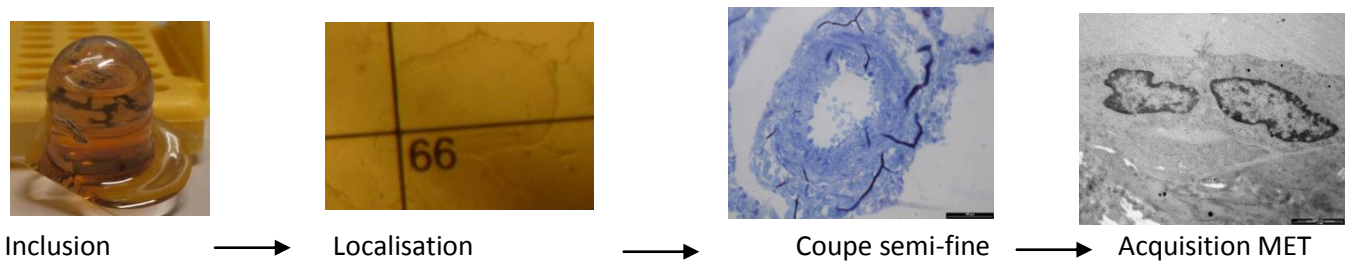
2- Immunofluorescence

- Sortir la boîte de lame et la laisser revenir à Température ambiante avant de l'ouvrir
- Hydratation des coupes en PBS 5/10 min
- NH₄ Cl 0,5M 4 x 5 min
- Rinçages en PBS 3 x 5 min
- Blocage PBS/BSA 2% 30 min
- Perméabilisation Saponine 0.1% 30 min
- Anticorps laire soit 2h à TA ou ON à 4°C
- Rinçages en PBS 4x3 min
- Anticorps Ilaire (fluorNano G ou Fluorescent + gold) 1 H
- Rinçages en PBS 4x3 min
- Coloration des noyaux DAPI (5µg/mL) 15 min à 37°C
- Rinçages en Eau bidistillée 4x3 min
- Montage des lamelles en Prolong Gold sur les boîtes Fluorodish

3-Acquisition et conservation à +4°C jusqu'à l'étape 2

Etape II : Préparation des échantillons en vue de la MET

Résumé de l'étape 2



Etape Inclusion directe – coupes/repérage - acquisition images

1- Inclusion Epon

- Les lamelles sont délicatement sorties du Tampon PBS
- Fixation GA 1% 30 min
- Rinçages PBS 3x3 min
- Post-fixation à l'Osmium 1% 1h
- Eau 3X3 min
- Déshydratation en éthanol 50%/70%/90% 5 min/chaque
- Déshydratation en éthanol 100% 3x5 min
- Substitution éthanol/epon : 1/1 – Pur 1heure chaque
- Inclusion
- Polymérisation

2- La lamelle de plastique est décollée du support en résine. Le marquage reste collé sur l'epon

3- Repérage/coupes semi-fines

- NB : si il y a plusieurs zones d'intérêt sur la surface et suffisamment distantes on peut recouper le bloc à l'aide d'une scie à lame fine
- Le bloc est recoupé autour de la zone d'intérêt (3-4 carreaux)
- Coupes semi-fines (0,5 µm)
- Coloration au bleu
- Visualisation et contrôle des zones coupées

4- Coupes ultra-fines

- Réaliser les coupes ultra-fines et les déposer selon leur surface sur des grilles de 150 à 200 mesh
- Contre coloration

5- Observation au MET

- Repérage des zones conjointes entre microscopie optique et électronique

ATELIER 2

LOCALISATION DE CELLULES EN CULTURE SUIVIES PAR UN MARQUEUR FLUORESCENT

PROTOCOLE

Cellules Adhérentes

On utilise la fluo pour repérer un événement rare (transfection, infection par un parasite, etc...). Grâce au repère sur la lamelle, on note la position des cellules marquées, on applique ensuite un protocole morpho classique. On coupe ensuite sur les zones repérées et on va en MET. Il n'y a pas vraiment de corrélation précise entre fluo et MET.

Matériel biologique :

- Cellules adhérentes poussées sur lamelles de verre à fond gravé (type Mattek/Ibidi)

Jour 1

1. Observation de la fluorescence
2. Repérage des cellules d'intérêt grâce aux repères
3. Fixation GA 1h
Rinçages 15min
Post-fixation 1h
Déshydratation 1h
Imprégnation résine 2-4h
Polymérisation
4. Préparation de grilles (dépôt des billes d'or)

Jour 2

5. Coupes résine (coupes sériées ?)
6. Contraste des coupes

Jour 3

7. Observation en MET
8. Merge : plus compliqué

NB : là on ne préserve pas la fluorescence, c'est peut-être moins intéressant. Mais on a de la résine morpho, c'est plus joli au MET.

REACTIFS ET MATERIELS

1-Réactifs

Fixateurs

- Paraformaldéhyde – ampoule de PFA 16%
- Glutaraldéhyde – ampoule de GA 25%
- Tampon PBS ou PO4 (Sorensen) 0.1M pH 7.4

Préparation du tampon Phosphate (Sorensen (PO4 0.5M pH 7.4))

Solution de phosphate monosodique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 156))

NaH_2PO_4	1.95 g
H2O	25 mL

Solution de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ (PM 358))

Na_2HPO_4	4,475 g
H2O	25 mL

Mélange tampon phosphate (volume final 100 mL) :

pH	Solution de phosphate monosodique	Solution de phosphate disodique
7,4	19 mL	81 mL

! volumes indicatifs, ajuster la solution de phosphate disodique avec la solution monosodique en mesurant le pH en continu.

Préparation des mélanges de fixation

Paraformaldéhyde 4% - Glutaraldéhyde 0.025% final

(! Le mélange de fixation doit se faire extemporanément, et ne se conserve pas)

PFA 16%	1 mL
GA 25%	0.004 mL
PO4 0.5M	0.8 mL
QSQ H2O MilliQ	2.196 mL
Vol final	4 mL

Paraformaldéhyde 4% final

PFA 16%	1 mL
---------	------

PO4 0.5M	0.8 mL
QSQ H2O MilliQ	2.2 mL
Vol final	4 mL

Milieu d'enrobage

- OCT (tissu Tek ou autre marque)

Réactifs pour les immunomarquages utilisés

- Bloquants aldéhydiques : NH4-Cl
- Agents de saturation des sites a-spécifiques : BSA
- Perméabilisant : Saponine
- Anticorps primaire :
- Anticorps secondaires : fluorescent : FITC Jackson IgG total
10nm F(ab')₂ fragment, Goat anti-mouse IgG (H et L)
(référence) 810.177 Aurion
- Dapi : 3-5 µg/mL (solution stock à 1 mg/mL)

Milieus de montage :

- Prolong Gold Antifade Reagent : référence 11539306 – Fisher Scientific

2- Matériels

Inclusion/Optique	Inclusion/MET
<ul style="list-style-type: none"> • Roue pour agitation/grand frigo à +4°C pour mettre la roue dedans • Grande pince (pour plonger dans l'azote liquide) • Glace • Lunettes de protection • Gants de protection • Parafilm • Azote • Lames de rasoir • Congélateur -80°C • Moules d'inclusion • Lamelles corrélatives graduées : 	<ul style="list-style-type: none"> • Capsules Beam 750µL pour inclusion • Ultramicrotome • Diamant histo et ultrafines • Lames de verre • Bleu de méthylène/azur II/Bleu de Toluidine • Plaque chauffante • Boîte de Pétri avec plaque de rangement • Grilles : Cu Formvar carbone 2x1mm - FCF2010-CU Cu Formvar film 2x1 mm - FF2010-CU

<p>CMC35-18 (Delta microscopies)</p> <ul style="list-style-type: none">• Seringues/pastettes• Fluorodish : FD35-100 (Fisher Scientific)• Cryostat• Microscope optique• Microscope à fluorescence et/ou confocal	<p>Cu-Pt 150/200 mesh</p> <ul style="list-style-type: none">• Papier whatman ashless (ref : 1440-090)
---	---