Association Française d'Histotechnologie

2ème journée à thème de l'AFH

L'IMMUNOFLUORESCENCE EN COUPE PARAFFINE

Anna Bencsik, Anses

Laurent Peno-Mazzarino, Laboratoire Bio-EC

Pourquoi faire de l'immunofluorescence en coupe paraffine ?

- avantages

  rapide sensible
  variété de la révélation
  marquage multiple
  imagerie

- inconvénients de l'immunofluorescence (IF)

  autofluorescence
  photoblanchiement
  bloc-filtres

- éléments déterminants concernant la préparation de l'échantillon

  type de tissu : un tissu réputé difficile la peau
  (forte autofluorescence)

  fixation, protocole d'inclusion en paraffine

- éléments déterminants concernant le protocole d'IF

  Méthode de déparaffinage
  Démasquages
  Perméabilisation
  Saturation
  Blocages

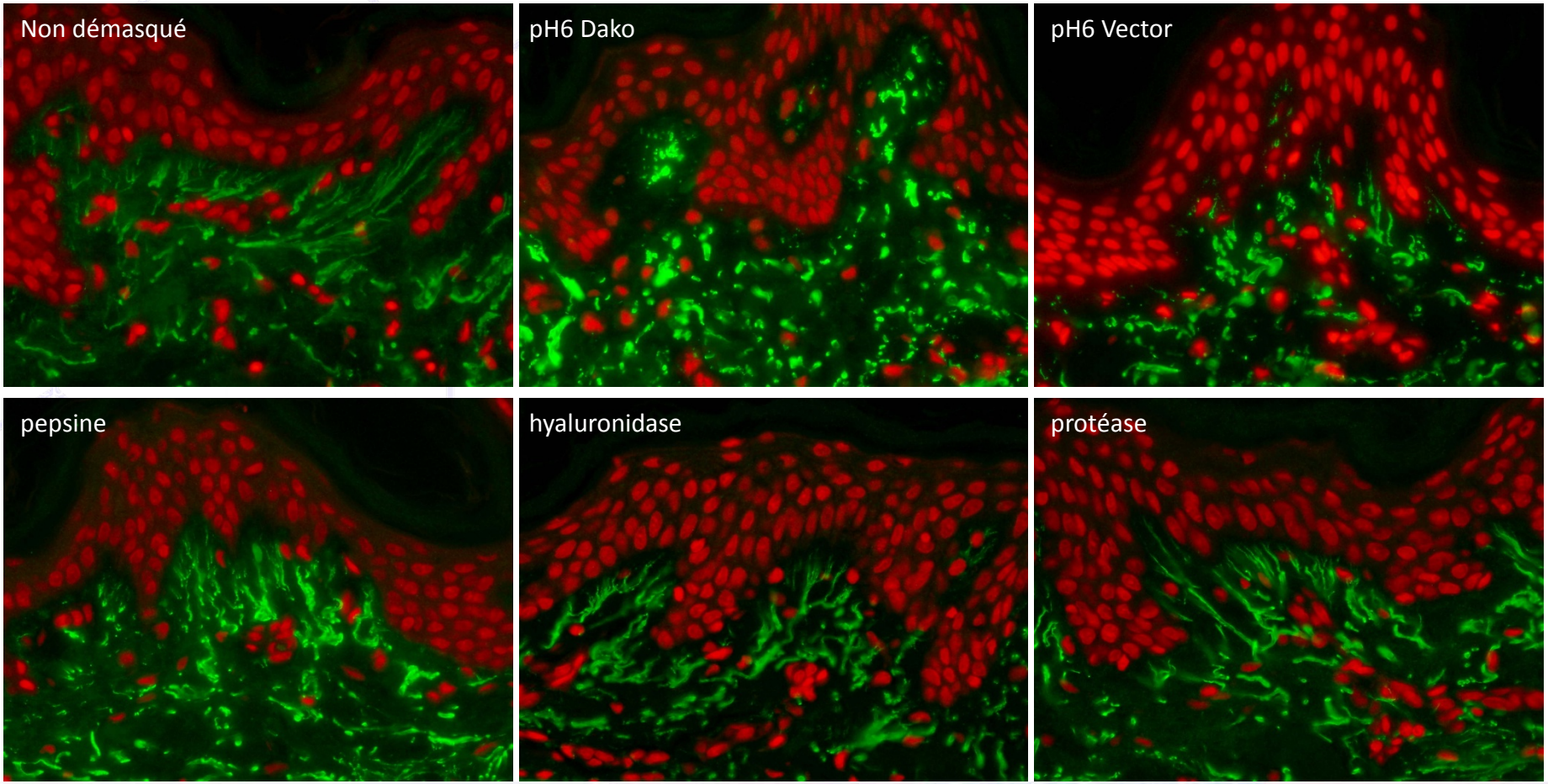
  Illustration à partir de l'étude de la peau

Méthode de déparaffinage:

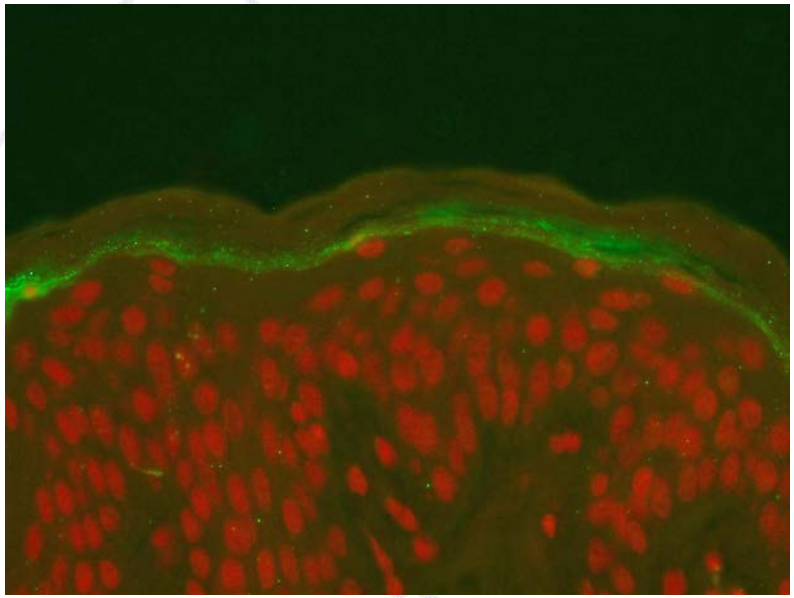
Classiques ou combinés avec démasquage (automates)

Démasquages: Tampons pH6 ou pH9 ou enzymatiques

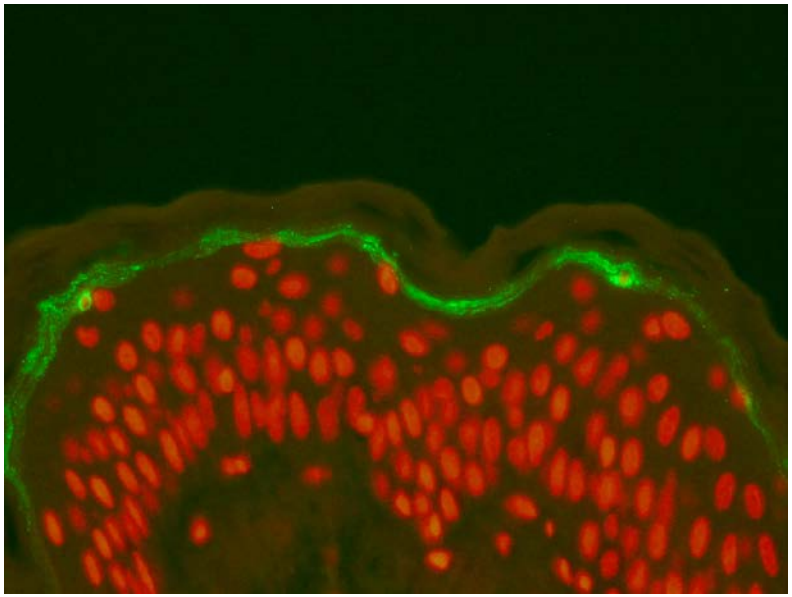
Elastine, 1 heure 1/100 en AF488



Influence du démasquage



IDE, démasquage tampon pH6 Dako
1 nuit au 1/25 en AF488



IDE, démasquage tampon pH6 Vector
1 nuit au 1/25 en AF488

Anticorps primaires:

Type de marquage (nucléaire, cytoplasmique, membranaire…)	Anticorps (couplé au fluorochrome ou non)	Poly/monoclonal	Espèce	Dilution	Incubation
cytosquelette	GFAP	poly	lapin	1/200	
Oligodendrocyte cytoplasmique	oligodendrocytes	poly	lapin	1/1000	
α-synucléine cytoplasmique	Clone 42	mono	souris		
α-synucléine cytoplasmique	C20R				
A-synucléine Phospho-Ser129 cytoplasmique		mono	lapin	1/300	
Macrophages cytoplasmique	Iba-1	poly	lapin	1/500	
Nucléaire	NeuN	poly	lapin	1/500	
Macrophages MbR et cyto	F4/80 (cl A3)	mono	rat	1/100	
GFP	Anti-GFP - ChIP Grade	poly	lapin		

Anticorps primaires:

Type de marquage (nucléaire, cytoplasmique, membranaire…)	Anticorps (couplé au fluorochrome ou non)	Poly/monoclonal	Espèce	Dilution	Incubation
Cytoplasmique	Béta-actine	Polyclonal	Lapin	1/50	1 h
Cytoplasmique	Béta-endorphines	Monoclonal	Souris	1/25 1/300	1 nuit 2h (Autostainer)
Membranaire	Desmogléine	Polyclonal	Lapin	1/800 1/800	1 nuit 2h (Autostainer)
Matrice extracellulaire	Fibronectine	Monoclonal	Souris	1/600 1/200	1 nuit 2h (Autostainer)
Membranaire	Filaggrine	Monoclonal	Souris	1/100 1/3200	1 h 1h (Autostainer)
Membranaire	Filaggrine 2	Monoclonal	Souris	1/800	1 h (Autostainer)
Cytoplasmique	IDE	Polyclonal	Souris	1/25	1 nuit
Membranaire	LEKTI	Polyclonal Monoclonal	Lapin Souris	1/200 1/200	1 nuit 1 nuit
Membranaire	Mucin 4	Polyclonal	Souris	1/50	1 nuit
Matrice extracellulaire	Pro-collagène 1	Monoclonal	Rat	1/50	1 nuit
Membranaire ± cytoplasmique	Vinculine	Monoclonal	Souris	1/100 1/400	1 h 1h (Autostainer)

Anticorps primaires:

Type de marquage (nucléaire, cytoplasmique, membranaire…)	Anticorps (couplé au fluorochrome ou non)	Poly/mono	Espèce	Dilution	Incubation	Révélation
CD4 humain (membranaire)	Clone 4B12	monoclonal	souris	0.1µg/ml	1h TAmb	Tyramide System Amplification
CD8 humain (membranaire)	Clone C8/144B	monoclonal	souris	0.1µg/ml	1h TAmb	Tyramide System Amplification
CD3 humain (membranaire)	Clone F7.2.38	monoclonal	souris	0.1µg/ml	1h tAmb	Tyramide System Amplification
CD163 humain (membranaire)	Clone EDHu-1	monoclonal	souris	0.1µg/ml	1h TAmb	Tyramide System Amplification
HLA-E humain (membranaire)	Clone MEM-E/02	monoclonal	souris	0.05µg/ml	1h TAmb	Tyramide System Amplification

Anticorps primaires:

Type de marquage (nucléaire, cytoplasmique, membranaire…)	Anticorps (couplé au fluorochrome ou non)	Poly/monoclonal	Espèce	Dilution	Incubation
Cytosquelette	Laminin				
	Collagen I				
	Collagen III				
	Collagen IV				
	Myosin Heavy Chain				
Marquage cytoplasmique	Cytokeratine 10	polyclonal	Rabbit	1/1000	1 H (Discovery de Ventana)
Marquage cytoplasmique	Cytokeratine 14	Clone LL002	Mouse	1/200	1 H (Discovery de Ventana)
Cellules satellite (nucléaire)	PAX7				

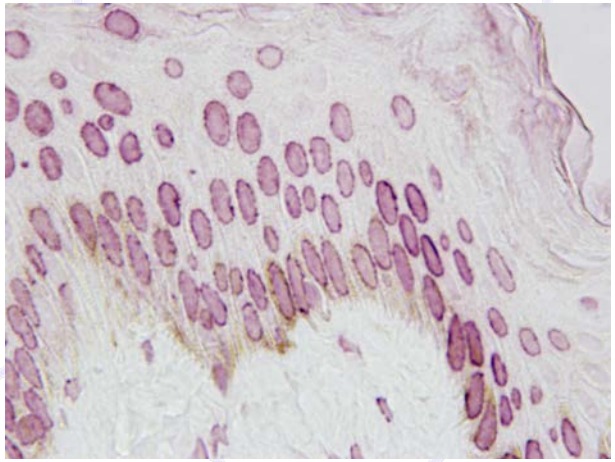
Anticorps secondaires et systèmes de révélation:

Méthode de révélation	Direct par primaire marqué Système polymère (Envision) HRP + TSA Biotine (ABC)

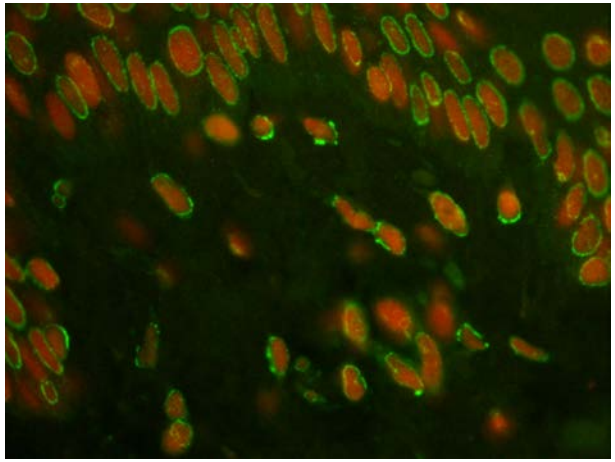
Exemple

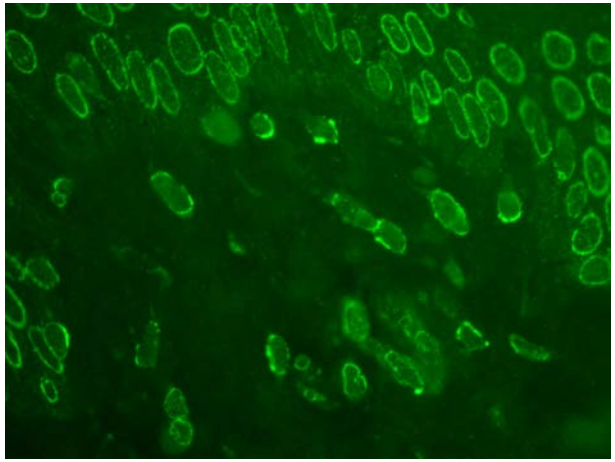
Validation des anticorps en transmis (HRP – AP)

Vinculine, démasquage tampon pH6 Vector
1 nuit au 1/50 en ABC-HRP(VIP)



Vinculine, démasquage tampon pH6 Vector
1 nuit au 1/50 en ABC-FITC





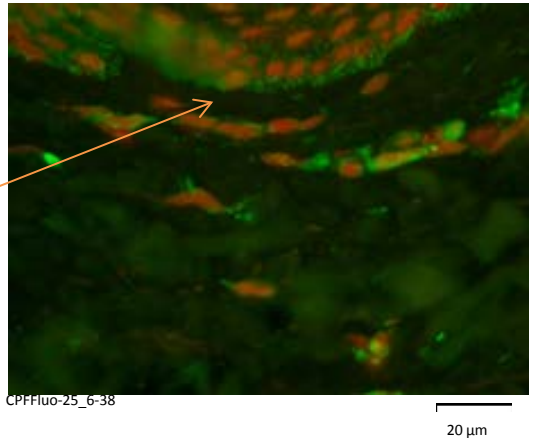
Exemple

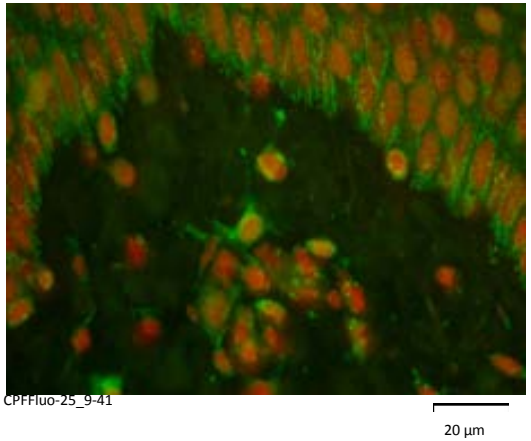
béta actine,
démasquage Presto Vector pH6
1 heure au 1/25 en ABC-FITC

Sensibilité

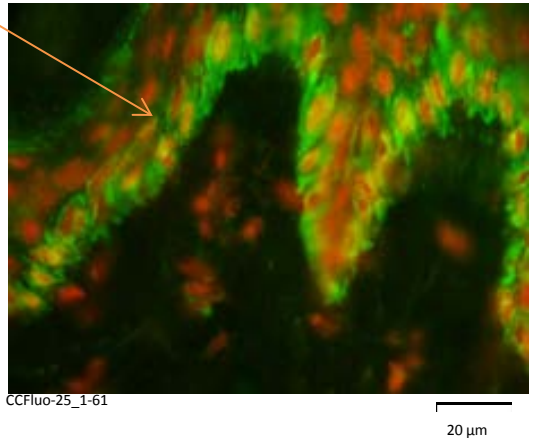
béta actine
Cryo 1 heure au 1/25 en ABC-FITC

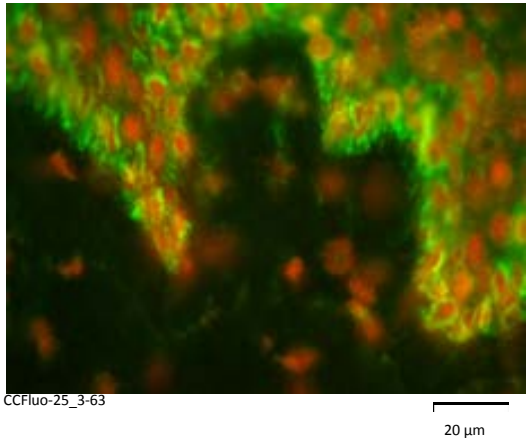
béta-Actine LS-B1040 -1Heure démasqué, CPF Fluo





béta-Actine LS-B1040 -1Heure , Cryo Fluo

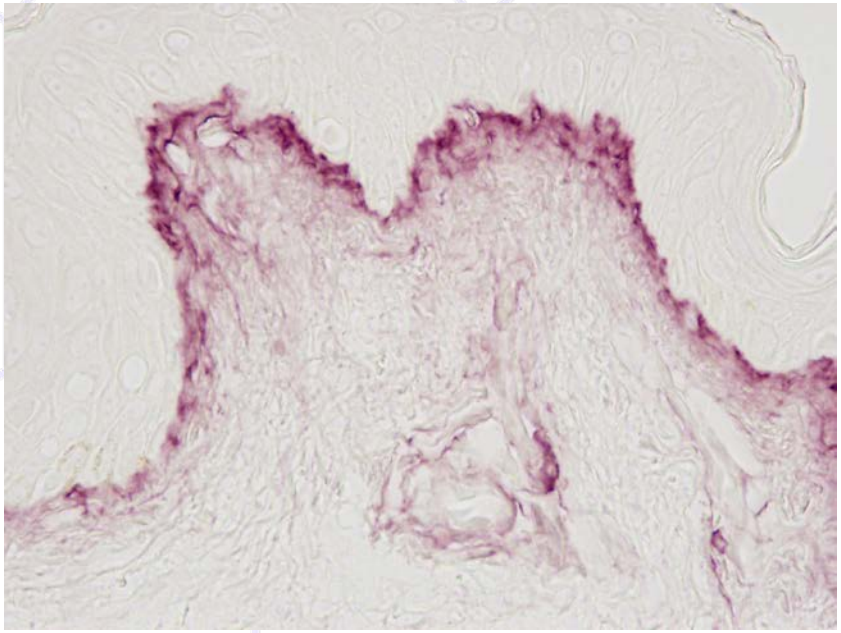




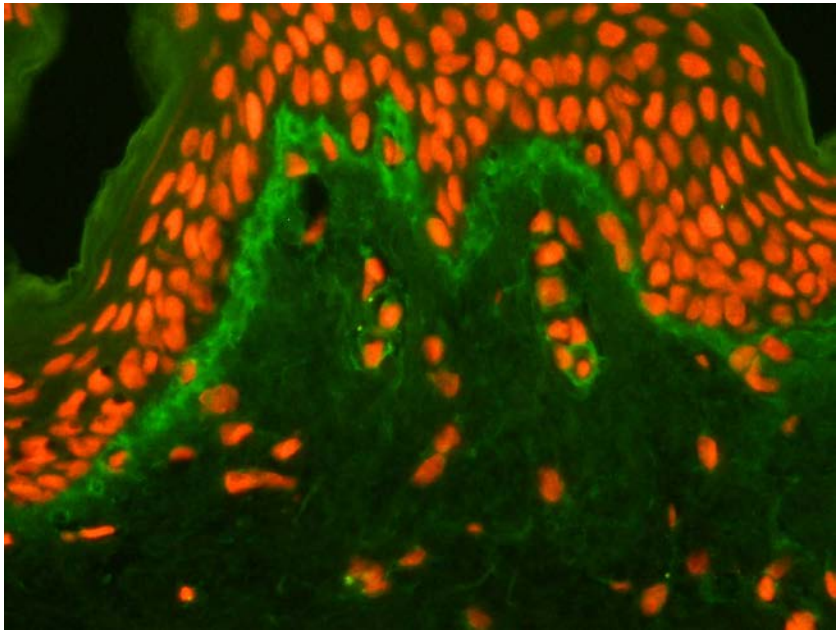
Exemple

Validation des anticorps en transmis (HRP – AP)

Pro-collagène 1, démasquage protéase
1 heure au 1/200 en ABC-HRP(VIP)



Pro-collagène 1 , démasquage protéase
1 nuit au 1/200 en ABC-FITC



Fluorochromes

Type de fluorochrome	Alexa350, 488, 546, 594, 647 FITC, R-PE, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5 Quantum dots

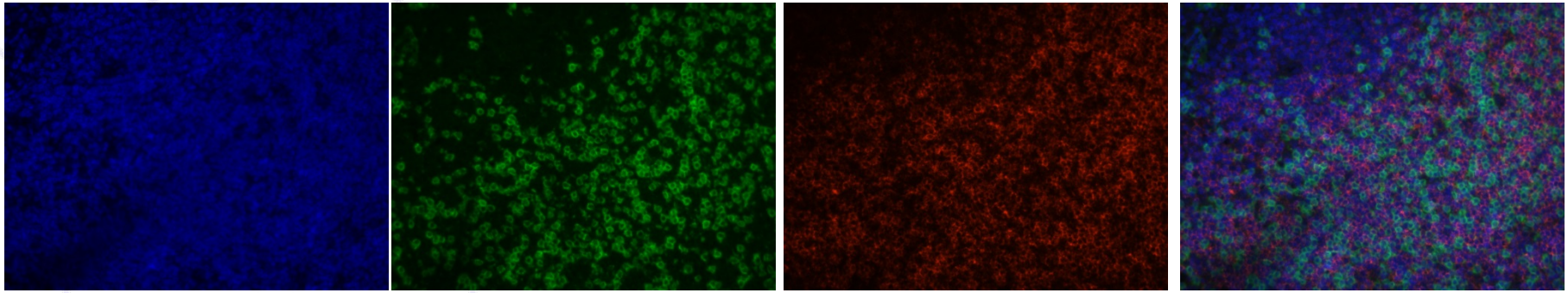
Contre coloration

Marque les noyaux: DAPI
Hoechst 33258 / 33342
Iodure de propidium

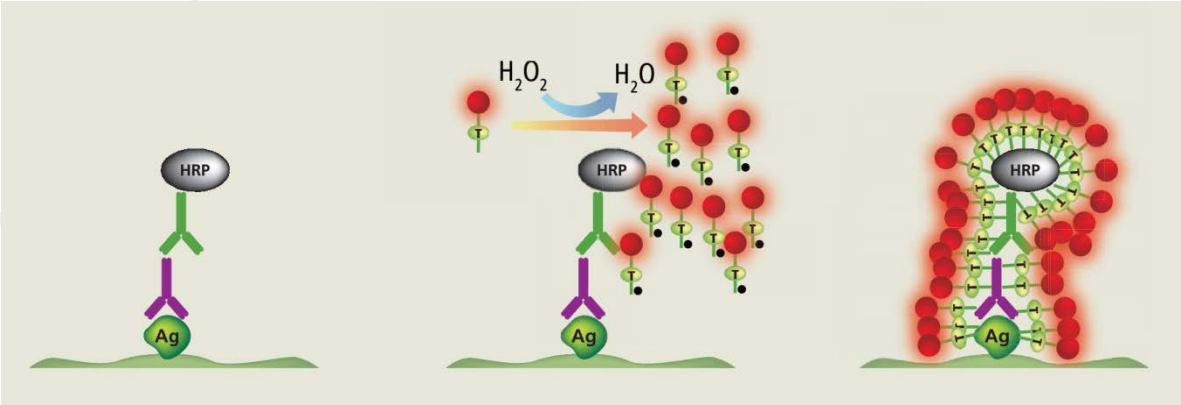
Toujours faite par une étape spécifique
➥ éviter le mélange avec le milieu de montage

Fluorochromes

Co-marquage sur de la rate humaine avec deux anticorps de la même espèce (mIgG1) révélation avec le système OPAL



DAPI | CD4-TSA fluoresceine | CD8-TSA Cy3 | Merge



PerkinElmer, inc

Milieux de montage et conservation des lames

6 milieux de montage (commerce ou recette maison)
plusieurs usages pour la conservation
à +4°C ou à -20°C
en fonction du milieu de montage

ProLong Gold	Commercial, cher
Vectashield (hardset)	Commercial
Fluoromount (hardset)	Commercial
Fluoromount G	Contient le DAPI
Aquamount	Contient le DAPI+ luttage au vernis à ongles
Mowiol®	A préparer soi-même, bon marché Excellente conservation

Difficultés rencontrées

- Comment lutter contre l'autofluorescence

Spectre d'émission similaire à la FITC
Recette à appliquer juste avant d'incuber
le réactif conjugué à la FITC

Quenching de l'autofluorescence de l'élastine et du collagène
Pontamine
fluorescence de l'elastine et du collagène passe du vert au rouge

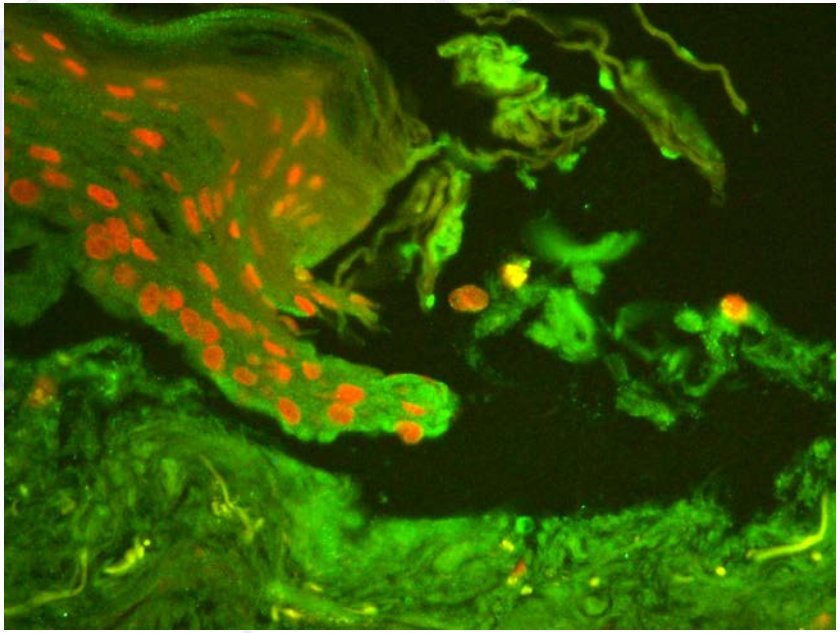
Quenching de l'autofluorescence de la lipofuscine
Noir Soudan B

Utilisation de lames verre et non plastique
même pour IF sur culture cellulaire ou cellules isolées

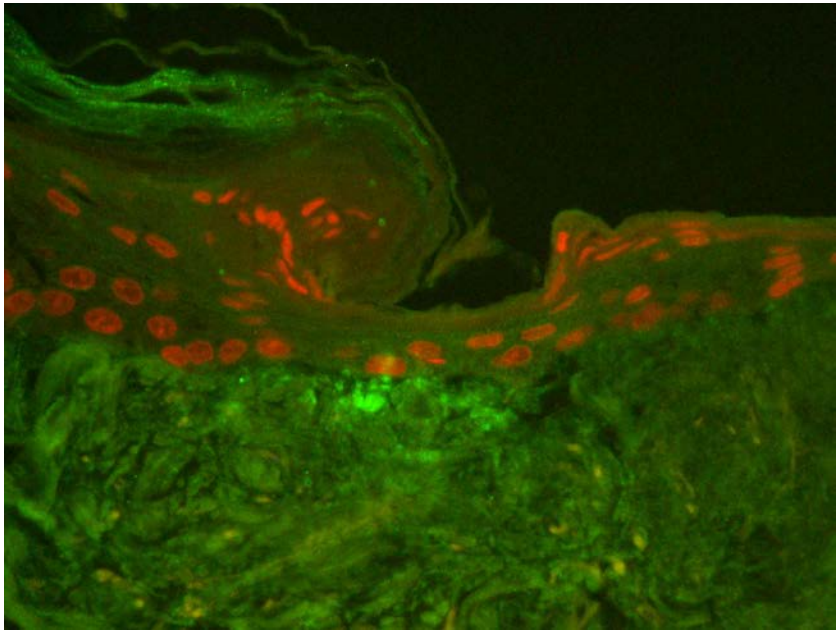
Autofluorescence

Influence du démasquage et bruit de fond

fibronectine, démasquage hyaluronidase
1 heure au 1/25 en ABC-FITC



fibronectine, démasquage pepsine
1 nuit au 1/600 en ABC-FITC



Au bilan : oui l'IF sur coupe paraffine est possible!

Avantages

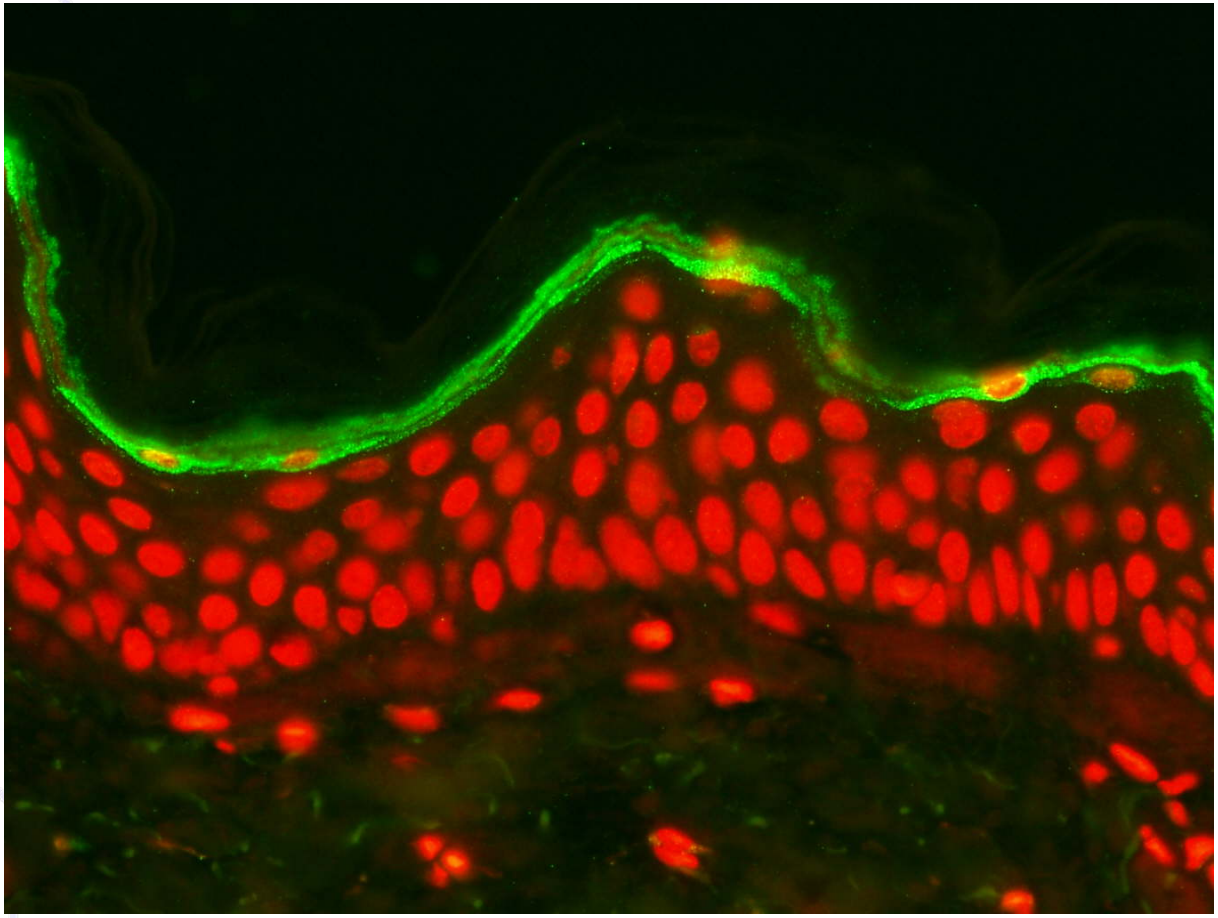
Images de marquage de qualité > par rapport au tissu congelé
Avantageux pour marquage multiple
qualité préservation des tissus
+ rapidité de mise en œuvre

Conditions optimales identifiées

- ✓ Fixation à froid
- ✓ Peu d'effets du bleu de toluidine
- ✓ Déparaffinage (Solvants > automate), 6 min/bain
- ✓ Démasquage contribue à diminuer autofluoresence
- ✓ L'utilisation de tensioactifs (Tween 20…) permet perméabiliser les membranes et augmenter le facteur de dilution de l'anticorps primaire
- ✓ Travailler sur des fenêtres de fluorescence hors réémission dans le vert
- ✓ Bien faire une dose réponse pour trouver la meilleure concentration de l'anticorps primaire
- ✓ Pour les co-marquages, tester l'ordre des marquages

Exemples:

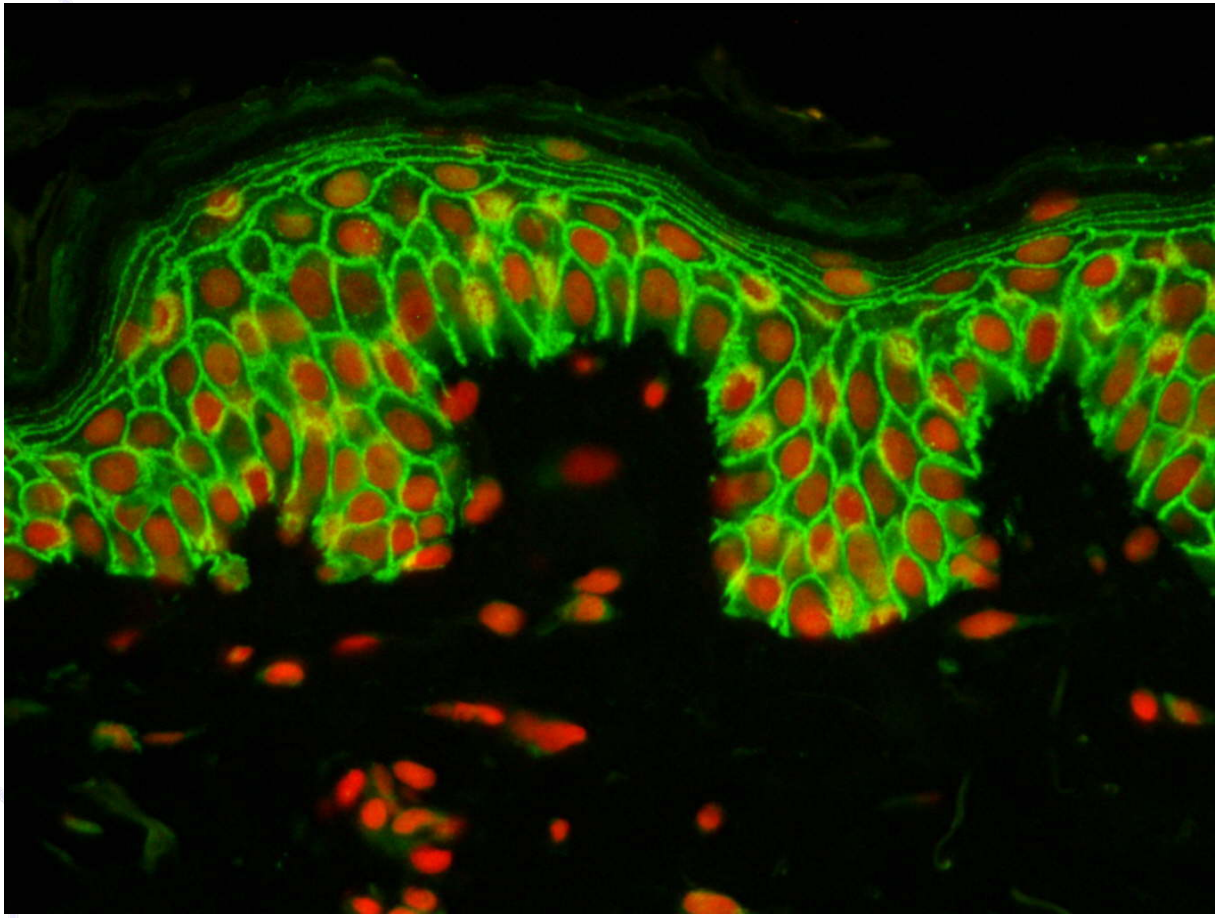
Filaggrine 2 au niveau du stratum corneum



Démasquage tampon pH6 Vector, 1 heure au 1/800 en AF488

Exemples:

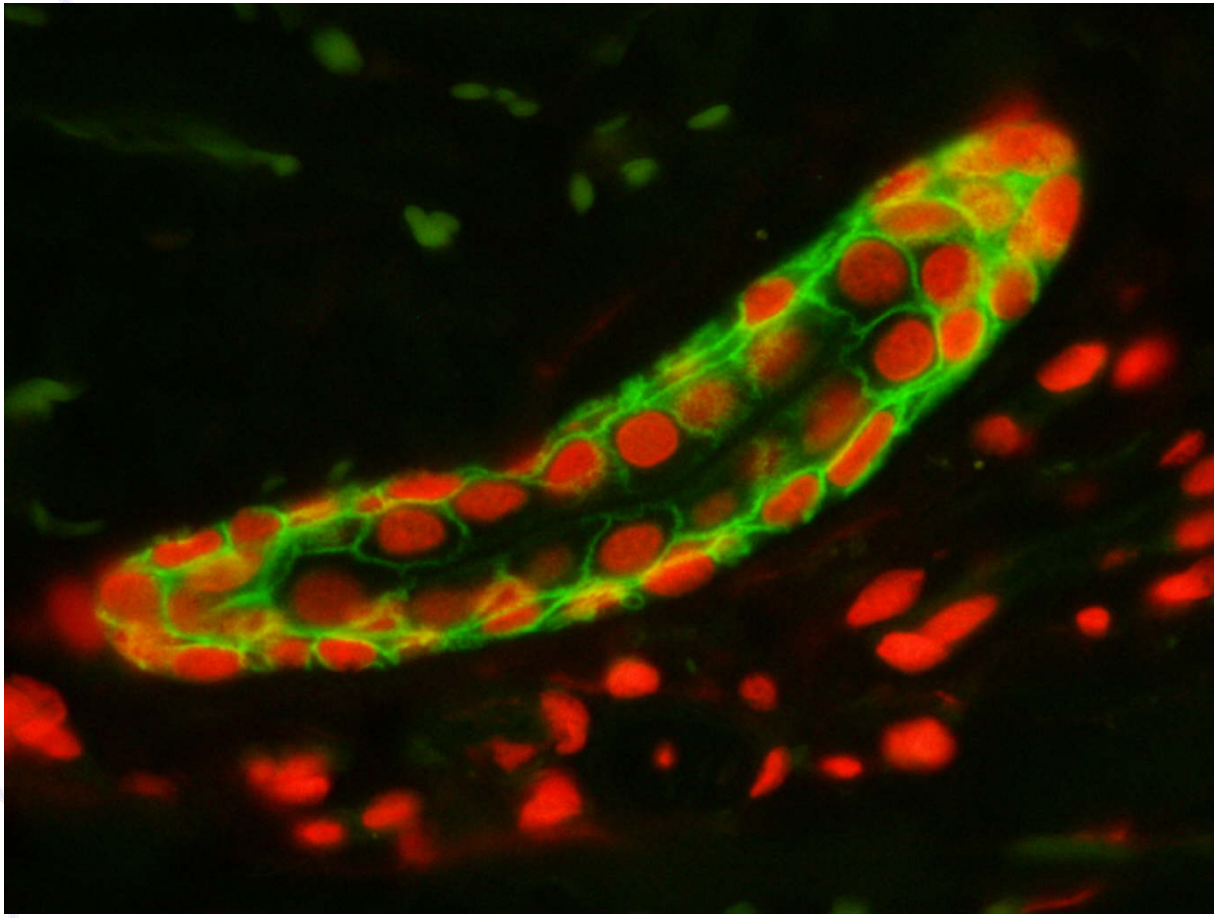
Desmogléine au niveau de l'épiderme



Démasquage tampon pH6 Vector, 1 heure au 1/800 en ABC-FITC

Exemples:

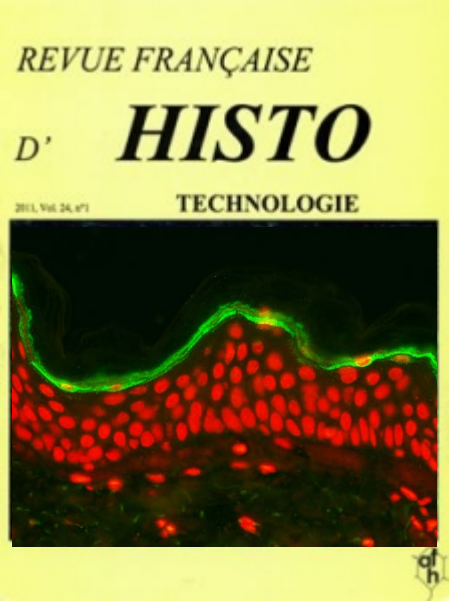
Desmogléine au niveau d'un capillaire sanguin dans le derme



Démasquage tampon pH6 Vector, 1 heure au 1/800 en ABC-FITC

Etape suivante

Rédaction d'un article
relatant tous les détails relatifs à cette journée à thème
à paraitre dans le prochain numéro de la Revue de l'AFH



Merci pour votre attention

Participants

Catherine Rochereau, Citoxlab, Evreux

Laurent Peno-Mazzarino, Laboratoire Bio-EC, Longjumeau

Arnaud Dujardin, Innate Pharma, Marseille

Alhassan Casse, Sanofi, Paris

Anna Bencsik, Anses - Lyon

Nathalie Accart, Novartis, Bâle