



HAL
open science

Démasquage et préservation antigénique par micro-ondes : Deux exemples biologiques : Les protéines PPAR et cavéoline

Josiane Aioun, Sophie Chat, Christian Bordat, Christine Longin

► To cite this version:

Josiane Aioun, Sophie Chat, Christian Bordat, Christine Longin. Démasquage et préservation antigénique par micro-ondes : Deux exemples biologiques: Les protéines PPAR et cavéoline. 14. Journées de Formation du RCCM (Réseau des Centres Communs de Microscopie), May 2015, Porticchio, France. 1 p. hal-01194119

HAL Id: hal-01194119

<https://hal.science/hal-01194119>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

Démasquage et préservation antigénique par micro-ondes : Deux exemples biologiques : Les protéines PPAR et cavéoline

Josiane Aïouna, Sophie Chatb, Christian Bordatc, Christine Péchouxb

a : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Recherche UMR1198, BDR, Jouy-en-Josas, France ; b : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Recherche UMR1313 GABI, Jouy-en-Josas, France; c : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Recherche UR902 Nutrition et Régulation Lipidique des Fonctions Cérébrales, Jouy-en-Josas, France

Les protocoles de fixation des tissus animaux en vue d'études immunocytochimiques (ICC) à l'échelle ultrastructurale utilisent classiquement le glutaraldéhyde à faible concentration afin de maintenir une bonne préservation des structures, cependant il présente un effet délétère sur la préservation des antigènes. Nous avons souhaité évaluer l'intérêt des micro-ondes dans un protocole de démasquage antigénique appliqué en pré-enrobage. Nous avons également comparé la préservation de l'antigénicité après une inclusion en résine hydrophile (LR White) pratiquée selon un protocole conventionnel ou sous irradiation par les micro-ondes.

1- Démasquage des protéines PPAR dans le cerveau

PPAR β/δ est un facteur de transcription présent dans les neurones. Sa localisation tissulaire est possible après fixation au paraformaldéhyde 4%. Cependant l'addition de glutaraldéhyde au mélange fixateur en vue d'études ultrastructurales diminue la sensibilité de l'ICC. Nous avons testé 2 protocoles de démasquage utilisant les micro-ondes et les avons comparés à une fixation PG classique et à une fixation PLP.

Tampon	Temp (°C)	Puissance (W)	Mode	Temps (min)	Temp (°C)	Puissance (W)	Mode	Temps (min)
Protocol I (adapté de Cummings et al. 2002)					Protocol II (adapté de Shi et al. 2001)			
Tampon citrate 10mM pH6	37	30	Pulse	5	95	30	Pulse	5
Tampon citrate 10mM pH6	20	0	Repos	2	20	0	Repos	2
Tampon citrate 10mM pH6	37	30	Pulse	5	95	30	Pulse	5

Cerveau de hamster - coupes vibratome 50 μ m

ICC sur coupes flottantes - Révélation DAB

	Sans traitement Micro-ondes	Fixation FG + Micro-ondes	
Fixation PG (Paraformaldéhyde 4% Glutaraldéhyde 0,125% en tampon P 0,1M)		Protocole I (37°C) 	PLP classique
Fixation PLP (Paraformaldéhyde 4% - Lysine -Périodate en tampon P 0,1 M)		Protocole II (95°C) 	PG Protocol I

III V : 3ème ventricule; Marquage cytoplasmique : \rightarrow ; Marquage nucléaire : \blacktriangle ; neurites: \blacktriangleright ; Chiasma Optique : OC ; III V : 3ème ventricule; Chiasma Optique : OC ; Marquage cytoplasmique \rightarrow ; Marquage nucléaire : \blacktriangle ; As : Astrocyte ; D : Dentrite ; Marquage PPAR β/δ : \rightarrow

2- Démasquage de la cavéoline-1 dans la Glande Mammaire

Les cavéolines sont des protéines localisées au niveau des membranes plasmiques, principalement au niveau des cellules endothéliales formant de véritables réseaux sur l'épaisseur des cellules. La cavéoline-1 (Cav-1) est un homo-oligomère qui est détectée dans les cellules endothéliales et myoépithéliales de la glande mammaire.

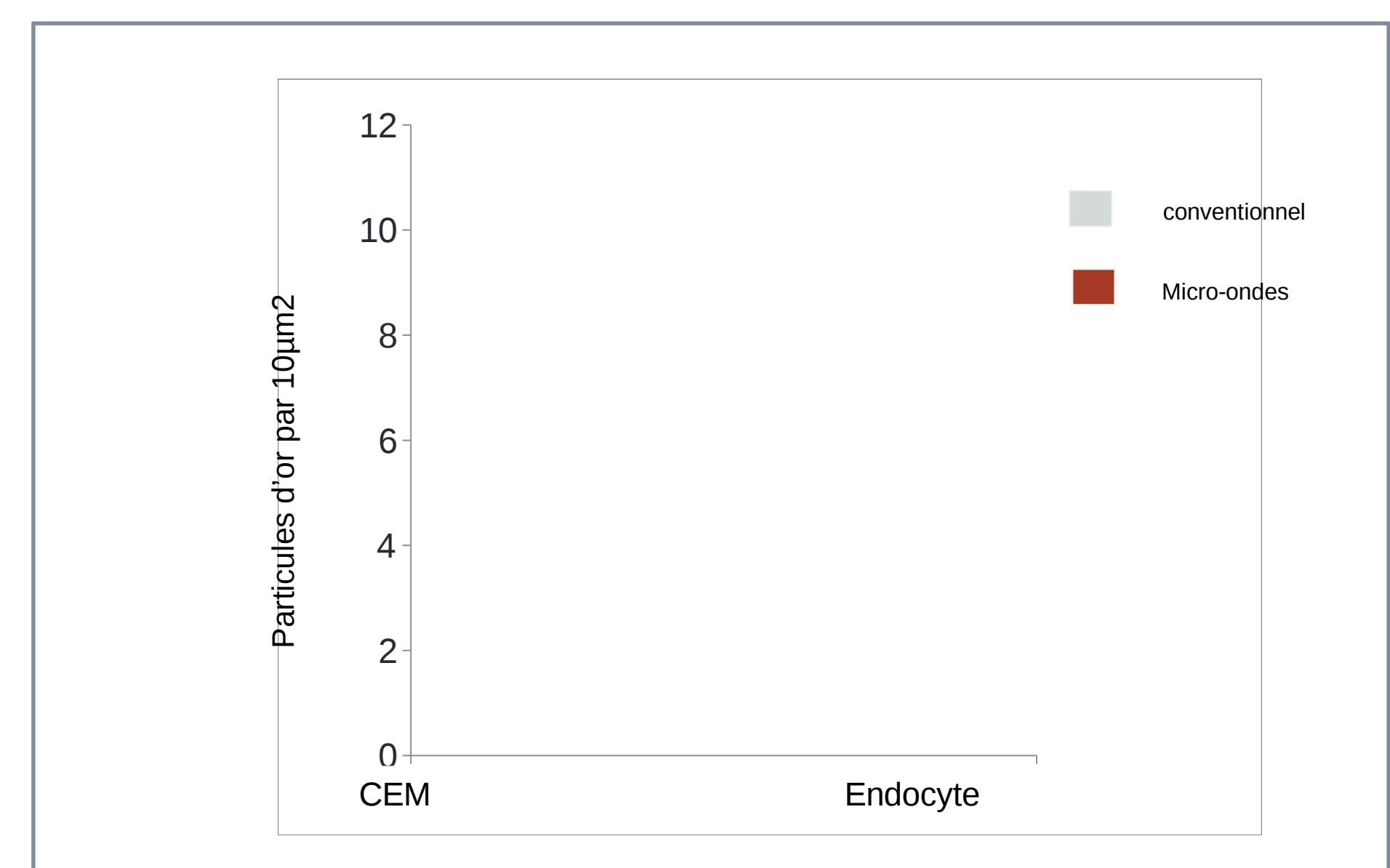
Nous avons testé la localisation de la Cav-1 dans la glande mammaire de souris à 10 jours de lactation. La glande mammaire a été inclus dans une résine LR-White, après fixation paraformaldéhyde (4%) - Glutaraldéhyde (0,25%). L'inclusion a été réalisé selon un mode conventionnel (à +4°C) ou dans un micro-onde dédié aux inclusions pour la microscopie électronique.

	Traitement Micro-ondes	Traitement conventionnel
Cellules endothéliales d'un vaisseau		
Cellules myoépithéliales		

Marquage cavéoline : \rightarrow Cavéoles : \blacktriangleright

L : Lumière ; CEM : Cellule Epithéliale Mammaire ; MEP : Cellule Myoépithéliale ; MEC : Matrice Extracellulaire ; RE : Réticulum Endoplasmique ; g.l. : Gouttelettes Lipidiques

Etapes	Procédure Micro-ondes				Mode conventionnel	
	Puissance (W)	Modes	Temp (°C) (min)	Temps	Temp (°C)	Temps (min)
Formaldéhyde 4%	15	Slope	28	3	20	60
Tampon de rinçage	15	Continue	20	5	4	30
Rinçage à l'eau	20	Slope	28	5	4	5
Déshydratation éthanol 30%	20	Slope	28	1	4	20
Déshydratation éthanol 50%	20	Slope	28	1	4	20
Déshydratation éthanol 70%	20	Slope	28	1	4	20
Déshydratation éthanol 90%	20	Slope	28	2	4	20
Déshydratation éthanol 100%	20	Slope	28	6	4	60
Ethanol/LR White (2 : 1)	10	Slope	28	3	4	60
Ethanol/LR White (1 : 1)	10	Slope	28	3	4	60
Ethanol/LR White (1 : 2)	10	Slope	28	3	4	60
LR White pure	10	Slope	28	6	4	720
Inclusion en capsules et polymérisation						
LR White : Etape 1	30	Slope	60	5	60	1140 (24hrs)
LR White : Etape 2	30	Slope	70	5		
LR White : Etape 3	30	Slope	85	15		
LR White : Etape 4	30	Slope	90	15		
LR White : Etape 5	30	Continue	90	15		
TEMPS TOTAL				124 (2 H)		2275 (38 H)



Conclusion : La fixation des tissus biologiques en particulier avec les aldéhydes induit des pontages entre les protéines, rendant leur accessibilité par les anticorps plus difficile. Par l'action des micro-ondes nous avons pu démontrer dans 2 systèmes biologiques que soit après fixation et traitement classique soit après inclusion via les micro-ondes, les protéines étaient mieux préservées ou leur accessibilité était augmentée.

Les micro-ondes se révèlent être un bon outil pour améliorer l'accessibilité des antigènes tout en conservant une bonne