

Marquages fluorescents dans des fibroblastes de souris

La biologie cellulaire est un domaine assez actif et ce malgré le peu de crédits accordés à ce domaine.

Les enjeux sont pourtant de taille, tant en immunologie que pour la recherche contre le cancer et pour la compréhension de tout phénomènes in vivo.

Je vous parlais il y a peu de la timide émergence de la RMN in vivo. Cependant, d'autres techniques ont fait leurs preuves en biologie cellulaire, avec leurs avantages et leurs inconvénients. L'une d'elle, le marquage de protéines par fluorescence est très utilisée et permet d'obtenir des informations sur la localisation et l'organisation de protéines à l'intérieur de la cellule.

Je ne parlerai pas ici de techniques un peu plus poussées telles que le [FRAP](#) ou le [FRET](#) mais de simples marquages fluorescents.

Plusieurs techniques permettent de rendre des protéines intracellulaires fluorescentes, Eddy nous parlais de biologie moléculaire et d'expression de gène codant pour des protéines fluorescentes se trouvant sur des plasmides.

Ici, nous parlerons de marquages sur des cellules fixées, c'est à dire figées dans un état particulier, mortes, et marquées.

Ce genre de technique permet d'étudier une protéine à différents stades du cycle de vie de la cellule ou en réponse à différents stress.

Nous allons marquer l'actine d'une part avec de la phalloïdine, et la tubuline ainsi que la vimentine d'autre part, par immunomarquage.

Protocole

Afin d'obtenir de belles images, il nous faut déjà, comme vous l'avez deviné, de belles cellules.

Ici, nous utilisons des fibroblastes de souris qui ont la particularité d'être adhérentes, c'est à dire qu'elle vont se fixer au support - la matrice extracellulaire - et vont s'étaler. Elles ne seront donc pas rondes mais aplaties, un peu comme une amibe.

On a donc des cellules, maintenant, procédons étape par étape, mais vous en connaissez déjà certainement beaucoup :

• Fixation

Cette étape consiste à figer les cellules dans un état particulier, en gardant leur forme, leur organisation et leurs protéines intactes.

Pour cela deux solutions, pour nos marquage de l'actine, on utilise du paraformaldéhyde - PFA - qui est une molécule capable de polymériser et de créer un réseau réticulé dense dans lequel toutes les protéines et les membranes sont figées.

Marquages fluorescents dans des fibroblastes de souris

Écrit par BelialL

Jeudi, 26 Septembre 2013 21:11 - Mis à jour Jeudi, 03 Octobre 2013 17:35

Pour nos immunomarquages, on place nos cellules à -20°C dans de l'éthanol.

L'action de l'alcool et du froid va figer les protéines et les membranes grâce à une déshydratation efficace.

De plus, cette méthode va aussi perméabiliser les membranes, étape essentielle comme nous allons le voir.

• Perméabilisation

Afin que nos marqueurs puissent entrer dans nos cellules, il faut que les membranes deviennent perméables.

En effet, la bicouche lipidique de celles-ci forme une barrière sélective très efficace, même lorsque les cellules sont mortes.

Comme nous l'avons vu, l'éthanol et la froid contribue déjà à perméabiliser les membranes, ainsi, nos cellules destinées à l'immunomarquage ont déjà validées cette étape.

En ce qui concerne les autres, on utilise un détergent, le Triton, afin de permettre à nos marqueurs de pénétrer.

• Saturation

Marquer des protéines c'est bien, marquer les bonnes c'est mieux.

Afin d'éviter que tout et n'importe quoi ne soit marqué, il faut saturer nos cellules. En effet, les marqueurs que nous allons utiliser ont beau être spécifiques des protéines que nous voulons étudier, il est possible qu'ils viennent se loger là où on ne les veut pas.

On utilise donc des protéines sans rapport avec l'expérience afin de "comblent les espaces vides".

On met parfois du lait pour cela, ou bien on utilise de la BSA, Albumine de Sérum Bovin.

• Marquage

Enfin la partie qui nous intéresse. Une fois nos cellules saturées, il faut les marquer.

Concernant le marquage de l'actine, c'est très simple, on utilise la phalloïdine-tétrarhodamineisothiocyanate, un composé extrait de l'Amanite phalloïde et qui se lie spécifiquement à l'actine.

Elle donne une couleur rouge lorsqu'elle est excitée.

Concernant nos immunomarquages, on utilise d'abord des anticorps primaires obtenus en exposant des animaux à notre protéine - un antigène - inactivée, l'animal produit alors des anticorps qui sont récupérés.

Marquages fluorescents dans des fibroblastes de souris

Écrit par BelialL

Jeudi, 26 Septembre 2013 21:11 - Mis à jour Jeudi, 03 Octobre 2013 17:35

Ensuite, on utilise des anticorps secondaires qui eux, sont spécifiques des premiers anticorps. De plus, ceux-ci portent aussi un marqueur fluorescent.

Ainsi, notre protéine d'intérêt est liée à l'anticorps primaire qui lui même est lié à l'anticorps secondaire qui porte le marqueur fluorescent. On rend donc indirectement notre protéine fluorescente.

Ici, on utilise comme marqueurs l'Alexa 488 qui colore en vert la vimentine et le Cyanine 3 qui colore en rouge les microtubules.

Cependant, que serait la science sans ses incontournables contrôles.

Il est en effet possible que malgré notre saturation, il y est encore des marquages non spécifiques.

Pour être sûrs que tout va bien, on fait un immunomarquage sur d'autres cellules mais avec des anticorps dirigés contre aucune protéines de nos cellules.

Ainsi, si il n'y a pas de liaison non spécifiques, ces anticorps sont éliminés pendant les lavages et aucune fluorescence n'apparaît.

• Montage

Ca vous connaissez bien, on utilise du glycérol avec du bleu de Hoechst qui va rendre nos noyaux bleus en fluorescence.

Résultats

Et voici donc les photos obtenues avec un Olympus BX41 en épifluorescence.

Les deux premières images concernent l'immunomarquage, on observe la tubuline en rouge qui forme des microtubules partant du centre de la cellule et qui permettent de maintenir sa forme et qui participe aux transports intra-cellulaires.

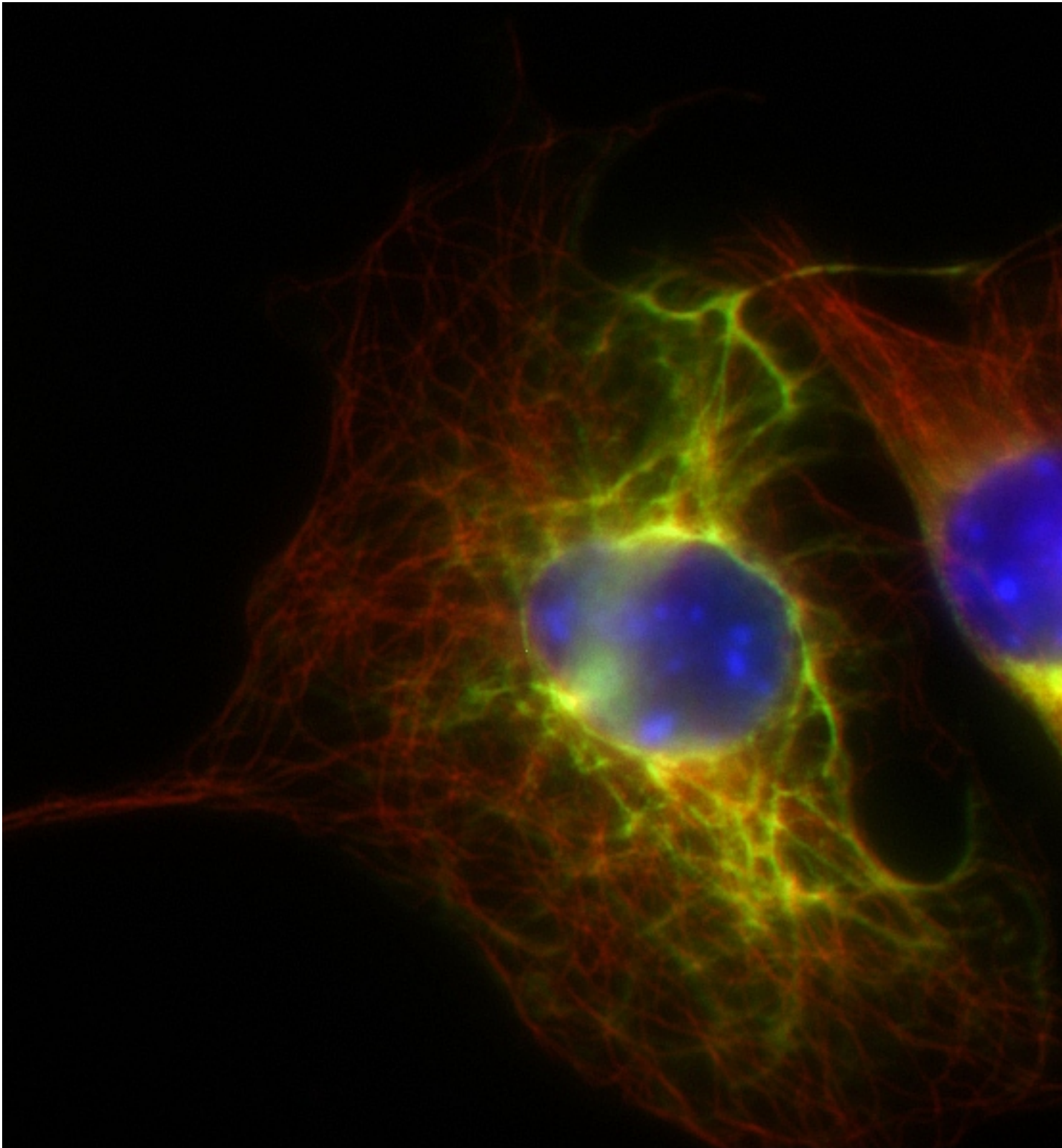
La vimentine, verte mais jaune sur la photo à cause de la superposition des couleurs, forme des filaments qui entourent la membrane du noyau et qui maintient sa forme.

L'actine, en rouge sur la dernière photo, permet à la cellule d'être motile, c'est à dire de se déplacer, de s'étaler et de répondre aux signaux extérieurs.

Marquages fluorescents dans des fibroblastes de souris

Écrit par BelialL

Jeudi, 26 Septembre 2013 21:11 - Mis à jour Jeudi, 03 Octobre 2013 17:35



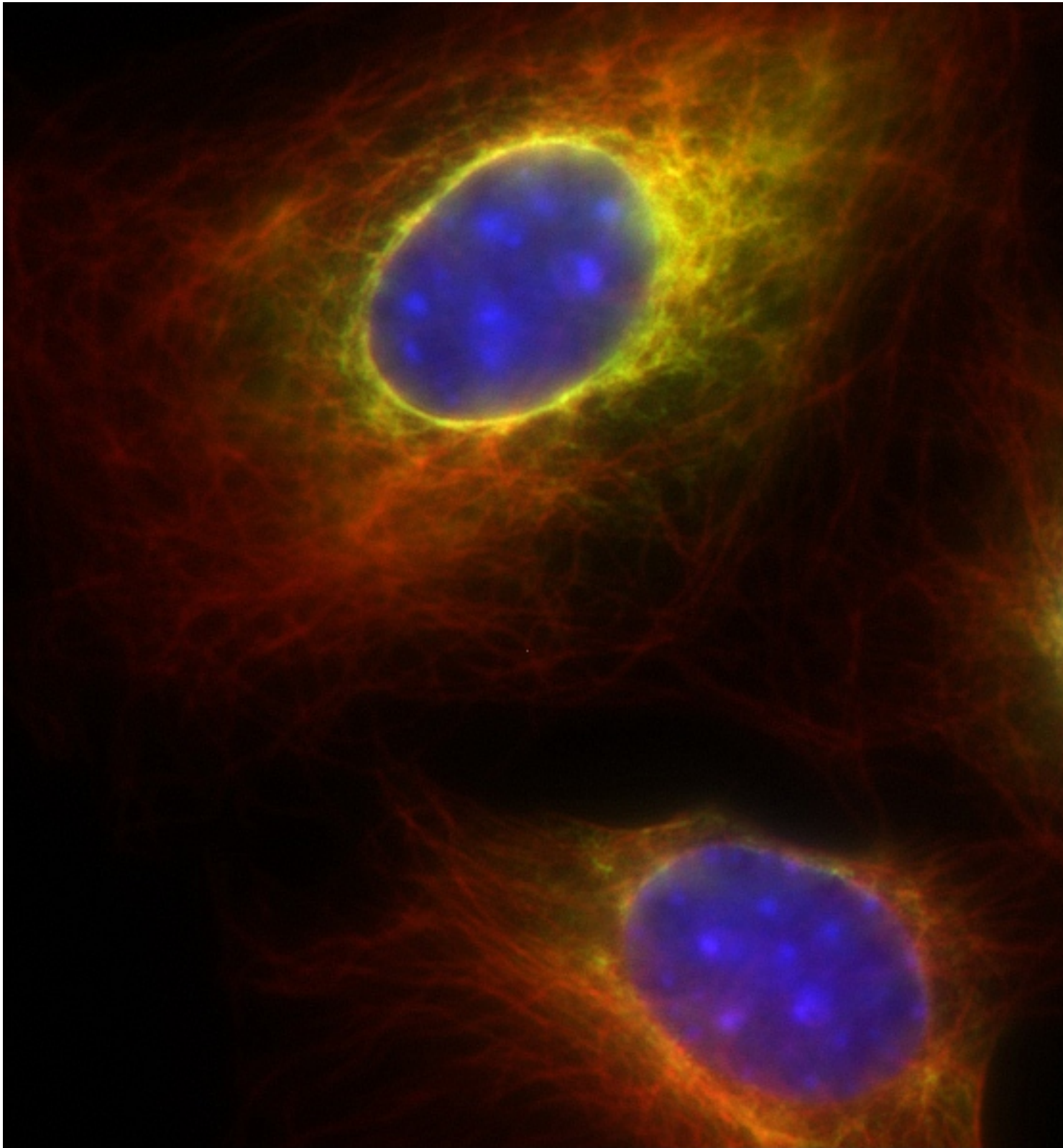
Micro / Macro : Olympus BX41 - Obj. 100x

Immonomarquage Tubuline/Vime
Fluorescence - Prép : Glycerol +

Marquages fluorescents dans des fibroblastes de souris

Écrit par BelialL

Jeudi, 26 Septembre 2013 21:11 - Mis à jour Jeudi, 03 Octobre 2013 17:35



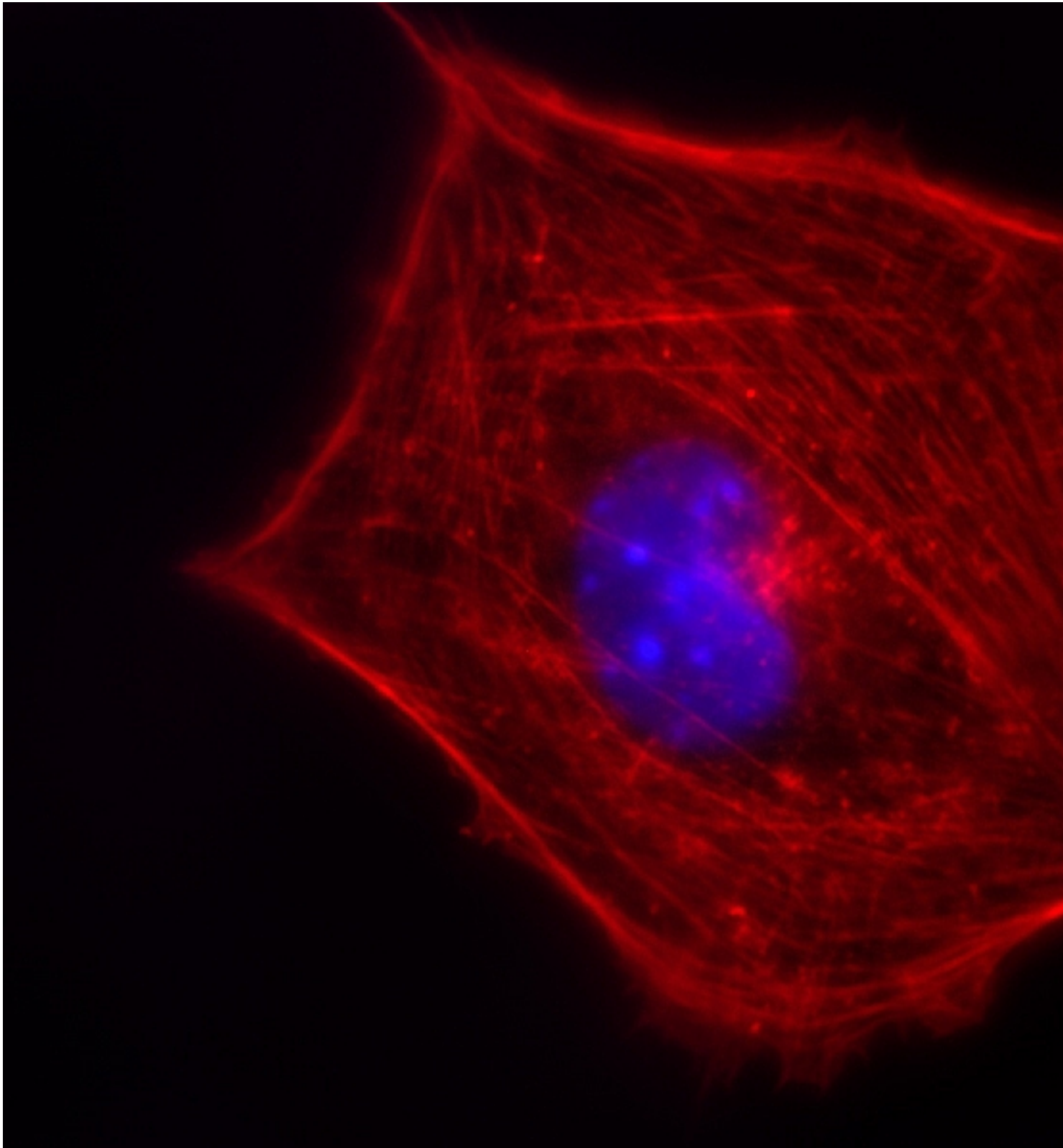
Micro / Macro : Olympus BX41 - Obj. 100x

Immonomarquage Tubuline/Vime
Fluorescence - Prép : Glycerol +

Marquages fluorescents dans des fibroblastes de souris

Écrit par BelialL

Jeudi, 26 Septembre 2013 21:11 - Mis à jour Jeudi, 03 Octobre 2013 17:35



Micro / Macro : Olympus BX41 - Obj. 100x

Marquage A
Fluorescence - Prép : Gly