

Table ronde

Hybridation *in situ*

Isabelle Léger
LBME IBCG du CNRS
118 route de Narbonne Toulouse
leger@ibcg.biotoul.fr



UNIVERSITÀ DI CORSICA
PASQUALE PAOLI

14^{èmes} Journées de formation du RCCM

Action Nationale de Formation (ANF) - CNRS

MÉTHODES ET TECHNIQUES DE DÉTECTION ET DE LOCALISATION MOLÉCULAIRE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

20 - 22 MAI 2015 PORTICCIO CORSE

Université di Corsica
Pasquale Paoli
Yann QUILICHINI
UMR SPE 6134
Service d'Etudes et de Recherche en Microscopie Electronique
Campus Grimaldi - BP 52
20250 CORTE
quilichini@univ-corse.fr
Tel. : +33 (0)4 95 45 00 06

rccm.cnrs.fr
www.univ-corse.fr

DELTA
Sfr
elexience
FEI
Leica
galion
JEOL
LFE



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Hybride moléculaire : une sonde nucléotidique complémentaire d'une cible nucléotidique



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Hybride moléculaire : une sonde nucléotidique complémentaire d'une cible nucléotidique

Sonde



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Hybride moléculaire : une sonde nucléotidique complémentaire d'une cible nucléotidique

Sonde

nature : double brin ADN (dérivé de plasmides ou généré par PCR)
ribosondes - différenciation des brins sens et antisens...
oligo-sonde



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

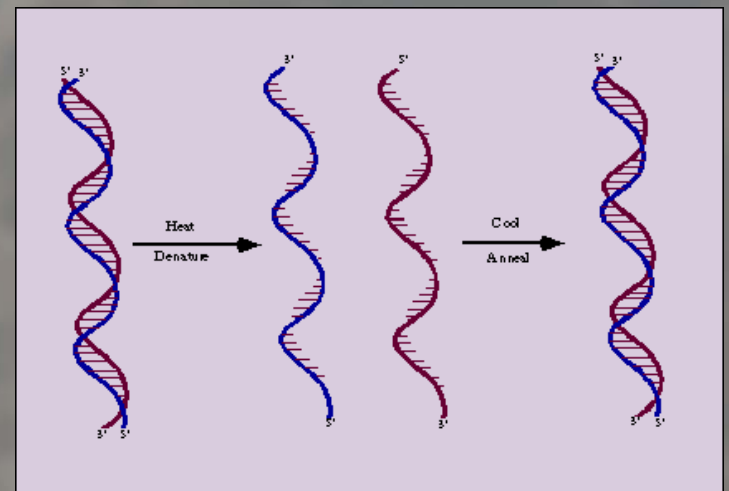
grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Hybride moléculaire : une sonde nucléotidique complémentaire d'une cible nucléotidique

Sonde

dénaturation : si double brin, mais également si structures secondaires





Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Hybride moléculaire : une sonde nucléotidique complémentaire d'une cible nucléotidique

Sonde

dénaturation : si double brin, mais également si structures secondaires
augmentation de température

conditions de dénaturation dépendent de la nature, taille, AT-GC...

T_m = température de fusion 50% des molécules sont dénaturées

plus la T_m est haute, plus le duplex est stable

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde

Cible : ADN ou ARN

séquences répétées

Les domaines majeurs d'application (ME) sont :

localisation de transcrits

organisation du nucléole (transcrits très abondants)

étude du cycle des virus



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

Sonde-Cible *in situ* (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Fixation : aldéhydes, acétate d'uranyl, ~~tétraxide~~ d'osmium



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »
dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** » dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »
dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$

tampon SSC : sodium salt citrate

formamide : solvant organique déstabilise les liaisons-H, permet d'abaisser la T_m



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »
dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$

tampon SSC : sodium salt citrate

formamide : solvant organique déstabilise les liaisons-H, permet d'abaisser la T_m

température : 5°C en dessous de la T_m



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »
dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$

tampon SSC : sodium salt citrate

formamide : solvant organique déstabilise les liaisons-H, permet d'abaisser la T_m

température : 5°C en dessous de la T_m

temps d'incubation (nucléation...) / 1h-overnight



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »
dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$

tampon SSC : sodium salt citrate

formamide : solvant organique déstabilise les liaisons-H, permet d'abaisser la T_m

température : 5°C en dessous de la T_m

temps d'incubation (nucléation...) / 1h-overnight

[sonde]



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** » dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$

tampon SSC : sodium salt citrate

formamide : solvant organique déstabilise les liaisons-H, permet d'abaisser la T_m

température : 5°C en dessous de la T_m

temps d'incubation (nucléation...) / 1h-overnight

[sonde]

dextran sulfate / Denhardt's (Ficoll) mime une augmentation en [sonde]



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

complémentarité entre sonde et cible mises en présence dans des conditions contrôlées de pH, de [sels], de température =« **stringence** »
dépendent du **couple sonde/cible** (nature, taille, AT-GC...)

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,6 \log [Na^+] - 500/pb - 0,61 (\%formamide) + 81,5$$

tampon SSC : sodium salt citrate

formamide : solvant organique déstabilise les liaisons-H, permet d'abaisser la T_m

température : 5°C en dessous de la T_m

temps d'incubation (nucléation...) / 1h-overnight

[sonde]

dextran sulfate / Denhardt's (Ficoll) mime une augmentation en [sonde]

sérum albumine de bœuf / tRNA / ADN de sperme de saumon



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

pré-inclusion : perméabilisation



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

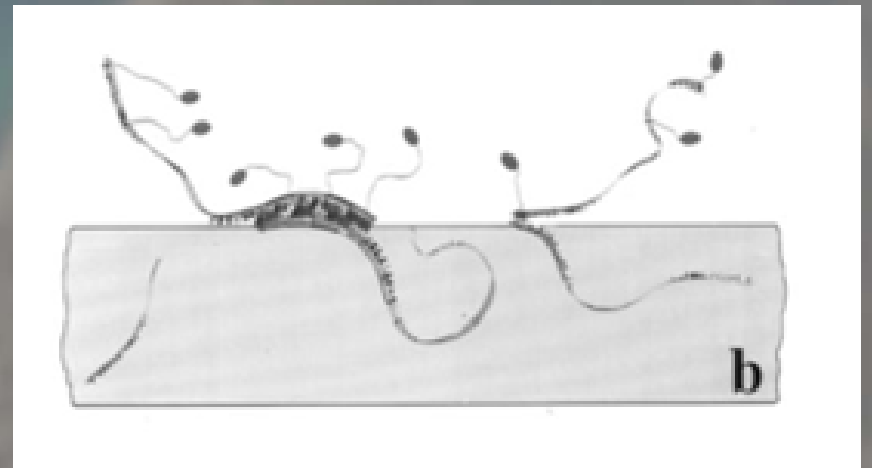
Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

pré-inclusion : perméabilisation

post-inclusion : marquage est restreint aux séquences accessibles à la surface de la coupe-cible abondante





Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation :

pré-inclusion : perméabilisation

post-inclusion : marquage est restreint aux séquences accessibles à la surface de la coupe-cible abondante

coupes congelées : pas de dénaturation possible?



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages : élimination des appariements imparfaits - stringence (température et [sels])
la température est augmentée et la concentration en sels est diminuée
le temps

Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

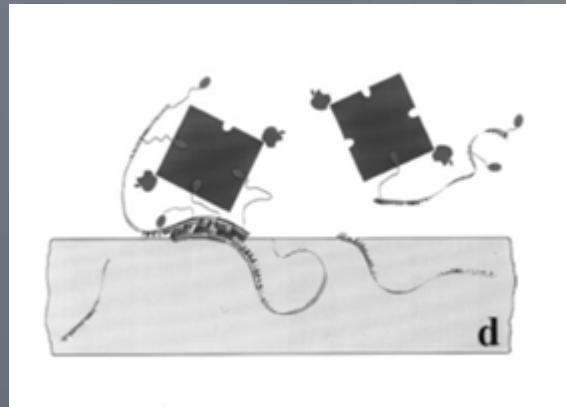
sonde-biotinylée

-reconnue par un anticorps anti-biotine conjugué à l'or
(immunocytochimie)

-reconnue par avidine (streptavidine) conjuguée à l'or

sonde-digoxigenin

-reconnue par un anticorps couplé à l'or (immunocytochimie)





Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

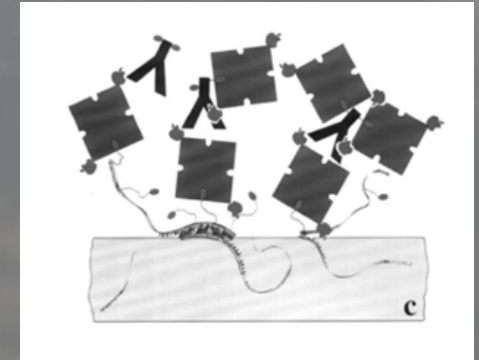
sonde-biotinylée

-reconnue par un anticorps anti-biotine conjugué à l'or
(immunocytochimie)

-reconnue par avidine (streptavidine) conjuguée à l'or

sonde-digoxigenin

-reconnue par un anticorps couplé à l'or (immunocytochimie)





Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

Contrôles :

afin de différencier le signal spécifique du signal non spécifique



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

Contrôles :

afin de différencier le signal spécifique du signal non spécifique

matériel biologique sans la séquence cible (ARN non exprimé, ADN absent)



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

Contrôles :

afin de différencier le signal spécifique du signal non spécifique

matériel biologique sans la séquence cible (ARN non exprimé, ADN absent)

sonde non complémentaire mais marquée



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

Contrôles :

afin de différencier le signal spécifique du signal non spécifique

matériel biologique sans la séquence cible (ARN non exprimé, ADN absent)

sonde non complémentaire mais marquée

sondes sens et anti-sens



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

Contrôles :

afin de différencier le signal spécifique du signal non spécifique

matériel biologique sans la séquence cible (ARN non exprimé, ADN absent)

sonde non complémentaire mais marquée

sondes sens et anti-sens

digestion des séquences cibles ARN par RNase-ADN par DNase



Hybridation *in situ* en ME

Localisation à l'échelle ultrastructurale d'un acide nucléique (ADN ou ARN)

grâce à la formation d'un **hybride moléculaire** (ADN-ADN, ADN-ARN)

in situ (tissu, cellules, chromosomes, acides nucléiques étalés...)

Sonde-Cible

Fixation

Hybridation

Lavages

Révélation

Contrôles :

afin de différencier le signal spécifique du signal non spécifique

matériel biologique sans la séquence cible (ARN non exprimé, ADN absent)

sonde non complémentaire mais marquée

sondes sens et anti-sens

digestion des séquences cibles ARN par RNase-ADN par DNase

+ les contrôles classiques de l'immunocytochimie



Hybridation *in situ* en ME

Développée pour la détection de séquences nucléiques en microscopie photonique, **cette approche a été adaptée** à la microscopie électronique

- dans un premier temps, avec des sondes radioactives (années 70)
laborieuse, peu résolutive
- ensuite, avec **sondes non isotopiques** (froides)/ groupe de D. Ward (années 80-90)