

# **ANALYSE TRIDIMENSIONNELLE DE LA CELLULE PAR TOMOGRAPHIE ELECTRONIQUE : le granule de Birbeck**

**Danièle Spehner<sup>a,\*</sup>, Willie Geerts<sup>b</sup>, Fabienne Proamer<sup>c</sup>, Daniel Hanau<sup>c</sup>, Patrick Schultz<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> IGBMC; INSERM, U596; CNRS, UMR7104, Illkirch, F-67400; Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000

<sup>b</sup> Molecular Cell Biology, Institute of Biomembranes, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, NL

<sup>c</sup> INSERM, U725, Etablissement Français du Sang-Alsace, Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000

**Résumé** - La tomographie en microscopie électronique [1] est un outil formidable pour visualiser les structures cellulaires ou moléculaires en 3-D. Pour reconstruire l'information 3-D, l'objet est incliné à différents angles dans le microscope. Une image est enregistrée pour chaque angle. Ces différentes vues sont ensuite combinées pour reconstruire le volume. Notre projet consiste à mettre en évidence à l'intérieur des cellules des complexes protéiques de quelques nm en taille. L'information tridimensionnelle est ici primordiale dans la mesure où ces complexes ne peuvent se distinguer dans des images de projection où ils sont noyés dans l'information sommée de l'épaisseur de la coupe. Pour mettre ces méthodes au point nous avons choisi d'étudier une structure plus grande localisée dans le cytoplasme des cellules et dont la morphologie est caractéristique, à savoir le granule de Birbeck.

## **1. Introduction**

Le granule de Birbeck [2] est une organelle que l'on trouve principalement dans les cellules de Langerhans de la peau [3]. Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques localisées dans l'épiderme et dans les épithéliums stratifiés des muqueuses. Elles sont impliquées dans la surveillance immunologique dans la mesure où elles peuvent capturer des antigènes, les dégrader partiellement et les présenter au CMH I et II. Le granule de Birbeck est décrit comme étant une structure en bâtonnet ou en raquette de tennis formée de deux membranes accolées et séparées par une zone régulièrement striée en fermeture éclair ou réseau cristallin d'une périodicité de 9nm. Des reconstructions 3-D de ces granules par Wolff [4] puis par Sagebiel et Reed [5], basées sur des observations de coupes sériées, montrent que ce sont plutôt des corps discoïdes avec une extension vésiculaire à la marge du disque. Plusieurs hypothèses quant à la formation de cette organelle particulière ont été avancées et il semblerait que la plus probable soit qu'elles dérivent d'une invagination de la membrane plasmique ou d'autres membranes cellulaires comme celles de l'appareil de Golgi. Des travaux récents [6] ont montré que la langerine, lectine spécifique pour le mannose, est associée au granule de Birbeck. D'autre part, l'expression de la langerine suffit pour former des pseudo-granules de Birbeck dans les cellules transfectées [6, 7]. Les auteurs concluent que le granule de Birbeck serait peut être un compartiment d'endocytose spécifique des cellules de Langerhans permettant le stockage de l'antigène et représenterait une voie particulière de présentation antigénique. Jusqu'à une époque récente, la microscopie électronique ne produisait qu'une image de projection 2-D qui ne reflète pas exactement la structure 3D. La tomographie électronique nous a permis de visualiser la morphologie de cette organelle dans l'épaisseur de la section afin de mieux comprendre la fonction de ce granule.

## **2. Préparation de l'échantillon**

La méthode de préparation de l'échantillon est cruciale pour préserver au mieux la structure des organelles avant d'enregistrer les tomogrammes. Les cellules épidermiques de la peau contiennent environ 1% de cellules de Langerhans. Ces cellules sont isolées à partir de biopsies humaines et enrichies en gradient de Ficoll. Elles sont ensuite soit fixées chimiquement puis enrobées d'une manière classique, soit cryo-immobilisées sous haute pression et cryo-substituées avant d'être enrobée dans une résine. Ces différentes méthodes de préparation seront discutées et commentées en regard des résultats obtenus.

## **3. Préparation de l'échantillon**

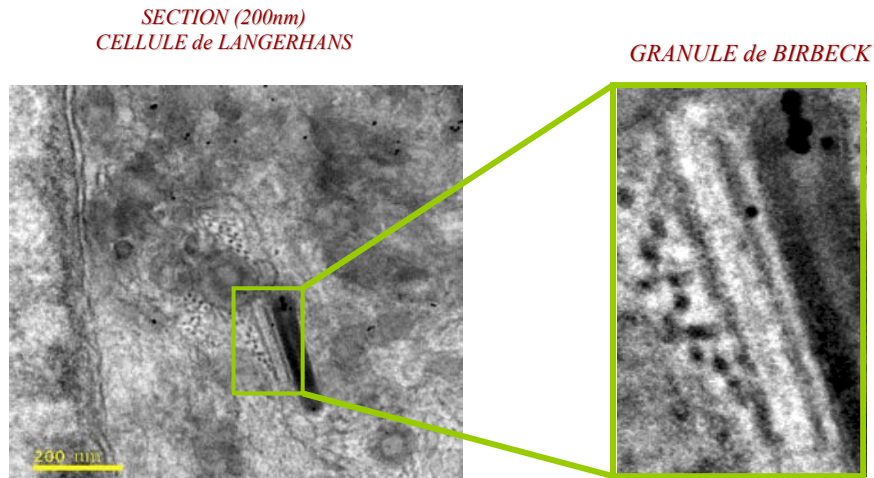
L'objectif de la tomographie électronique est de reconstruire une image 3-D à partir d'images de projection 2-D. Cette méthode comprend plusieurs étapes :

- l'acquisition automatisée au microscope d'images inclinées du granule de Birbeck
- l'alignement de ces séries
- la reconstruction 3-D du volume par rétro-projection pondérée ou par des méthodes algébriques
- la représentation tri-dimensionnelle du volume par isosurfaces et segmentation

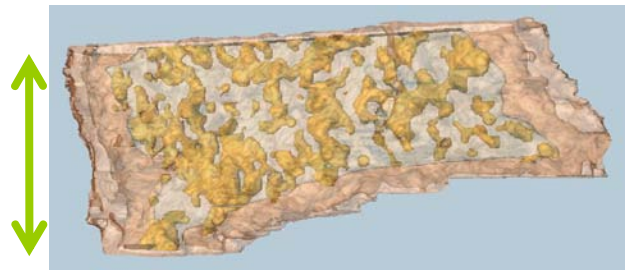
---

\* Auteur à contacter : danièle.spehner@igbmc.u-strasbg.fr – Tel : 03 90 24 48 06

#### 4. Résultats obtenus



RECONSTRUCTION 3D du GRANULE de BIRBECK



#### 5. Références

- [1] A.J. Koster, et al., *Perspectives of molecular and cellular electron tomography*. J Struct Biol. **120** (3) (1997) 276-308
- [2] M.S. Birbeck, A.S. Breathnach, and J.D. Everall, *An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo*. J Invest Dermatol. **37** (1961) 51
- [3] P. Langerhans, *Über die Nerven der menschlichen Haut*. Virchows Arch Path Anat. **44** (1868) 325-337
- [4] K. Wolff, *The fine structure of the Langerhans cell granule*. J Cell Biol. **35**(2) (1967) 468-473
- [5] R.W. Sagebiel and T.H. Reed, *Serial reconstruction of the characteristic granule of the Langerhans cell*. J Cell Biol. **36**(3) (1968) 595-602.
- [6] J. Valladeau et al., *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules*. **12**(1) Immunity (2000) 71-81
- [7] R. McDermott, et al., *Reproduction of Langerin/CD207 traffic and Birbeck granule formation in a human cell line model*. J Invest Dermatol. **123**(1) (2004) 72-7