

Méthode d'étude des cellules

On distingue 3 grands types de microscopie

- Microscopie optique (= photonique)
- Microscopie électronique
- Microscopie atomique

Résolution : capacité à distinguer deux objets disposés de façon contiguë (=adjacente, proche)

La résolution minimum pour l'œil nu est de **0,2 mm** (= 200 μm)

I. La microscopie optique (= photonique)

Résolution : entre 0,2 mm et 200 nm (= 0,2 μm)

- Permet d'observer les cellules et les organelles

A. La microscopie optique conventionnelle

On observe avec une lumière directe des échantillons de tissu qui vont être fixés, rigidifiés, coupés puis colorés (initialement la cellule est transparente)

NB 1 : La fixation entraîne la **mort** de la cellule

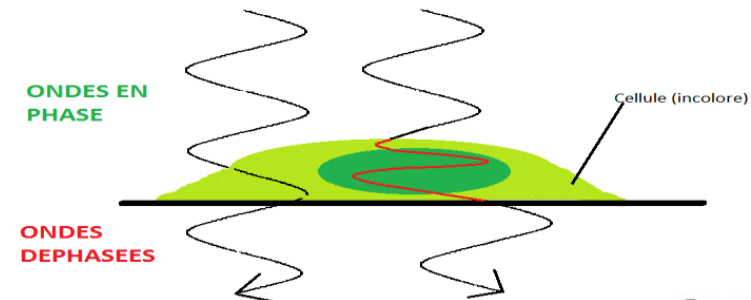
NB 2 : la microscopie optique conventionnelle étudie donc des échantillons morts

B. La microscopie à contraste de phase

Technique permettant de voir des cellules vivantes en utilisant les propriétés de réfraction de l'échantillon
Le microscope de phase va amplifier le déphasage et améliorer le contraste en retardant la lumière déphasée par rapport à la lumière non déphasée

NB 1 : Le contraste est dû aux variations des indices de réfractifs des différents milieux cellulaires

NB 2 : Cette technique ne nécessite pas la mort de la cellule, on peut donc faire de la **microscopie time-lapse** (=microcinéma)



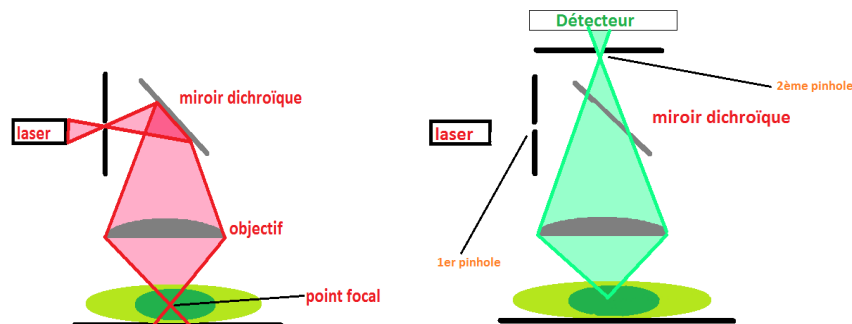
C. La microscopie à fluorescence

Permet d'observer des molécules de manière indirecte par émission de photons par celles-ci (voir plus bas)

D. La microscopie confocale

La microscopie confocale est une *technique de microscopie à fluorescence*, elle permet l'étude tridimensionnelle des cellules et des tissus

NB : La microscopie confocale permet d'obtenir des images très précises, très nettes et permet d'analyser l'échantillon dans son épaisseur (selon un axe x, y, z)



Miroir dichroïque : miroir ayant la capacité de laisser passer certaines longueurs d'ondes et de réfléchir les autres

E. La microscopie à super résolution

Technique basée sur l'excitation séquentielle des fluorochromes, permettant d'obtenir une image beaucoup plus nette

II. La fluorescence

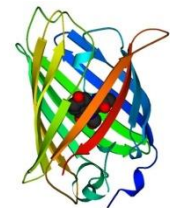
Principe : on greffe à des molécules des marqueurs fluorescents (= **fluorochromes**) ce qui nous permet de dépasser en microscopie optique la limite théorique de 200 nm

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie (= lumière d'excitation) et de la restaurer sous forme de fluorescence (= lumière d'émission)

Rappel : $E = \frac{h.c}{\lambda}$ or $\lambda_{absorption} < \lambda_{émission}$
donc $E_{absorption} > E_{émission}$

1. Molécules fluorescentes

➤ GFP (Green Fluorescent Protein)



La GFP est une molécule qui est naturellement fluorescente, cette protéine possède la forme d'une tonneau avec 3 acides aminés centraux responsables de la fluorescence (= **chromophore**)

La GFP *absorbe* dans le **bleu** et *émet* dans le **vert**

En modifiant le chromophore de la GFP on obtient des variant de fluorescences : CFP (Cyan), YFP (Jaune) ...

NB : La fluorescence est une propriété intrinsèque de la GFP, ainsi on peut exprimer cette molécule dans n'importe quelle cellule de n'importe quel organisme

➤ Rhodamine

La Rhodamine *absorbe* dans le **vert** et *émet* dans le **rouge**

➤ Fluorescéine

La Fluorescéine *absorbe* dans le **bleu** et *émet* dans le **vert**

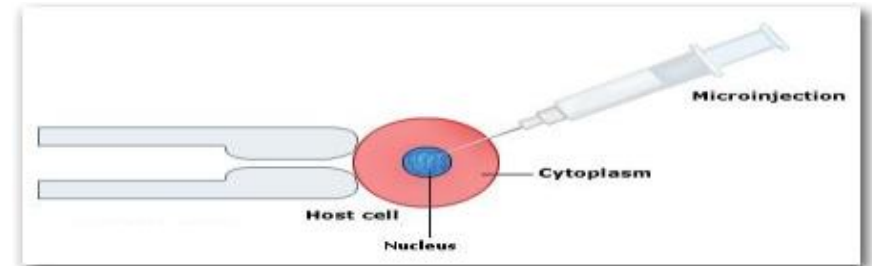
2. Introduction de molécules fluorescentes

On greffe un fluorochrome à la molécule que l'on souhaite étudier, en général une protéine, *Théoriquement* cela ne modifie pas les propriétés de la molécule étudiée, il existe plusieurs méthodes pour introduire cette molécule dans la cellule

❖ La microinjection

Se passe sous microscope, avec une micropipette en verre on injecte le fluorochrome cellule par cellule

⇒ Procédé long et fastidieux



❖ L'électroporation

Les cellules sont placées entre deux électrodes et subissent un choc électrique bref entraînant l'apparition de trous transitoires dans la membrane plasmique permettant l'entrée des fluorochromes dans la cellule

NB : les *trous* ne sont que transitoires, au bout d'un moment la membrane plasmique est reformée

⇒ Permet de traiter de nombreuses cellules à la fois mais les traumatise (possibilité d'une modification des propriétés cellulaires du au choc électrique)

❖ Vectorisation par vésicules

On met les cellules en présence des vésicules contenant les fluorochromes. Ces vésicules vont fusionner avec les membranes plasmiques des cellules et ainsi déverser leur contenu dans le cytoplasme

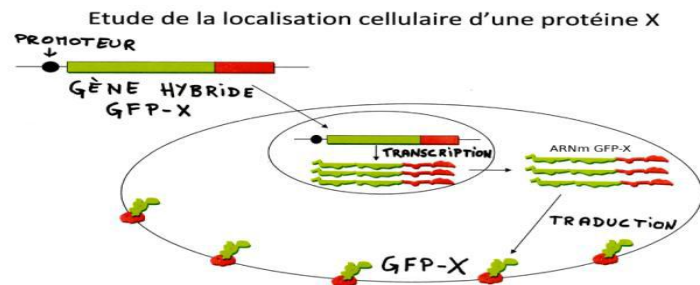
⇒ Méthode la plus douce et physiologique qui existe

❖ Expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente

Le but n'est pas de transférer une molécule fluorescente dans la cellule mais de faire en sorte que la cellule l'exprime elle même

On a le gène qui code pour la protéine que l'on souhaite étudier, on va lui greffer la séquence nucléotidique correspondant à la GFP nous donnant un gène hybride GFP-Protéine X

On introduit ce gène hybride par transfection dans la cellule, il sera ensuite reconnu par la machinerie cellulaire comme l'un de ses propres gènes, il sera reconnu par l'ARN polymérase qui va le *transcrire* en ARNm puis cet ARNm sera *traduit* en GFP-Protéine X par les ribosomes. Ainsi la fluorescence va nous permettre de suivre la localisation cellulaire d'une protéine X dans la cellule.



Dans cet exemple la fluorescence est localisée au niveau de la membrane cellulaire, cela **SUGGÈRE** que la protéine X est une protéine membranaire

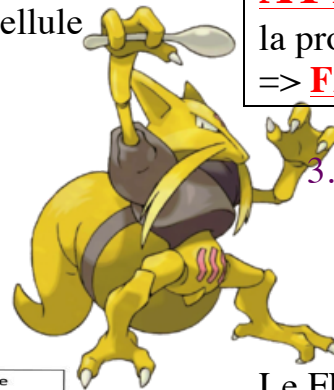
SUGGÉRER / DÉMONTRER

En biologie cellulaire, quand on démontre c'est qu'il n'y a pas d'autre interprétation possible.

Quand on suggère, c'est que l'interprétation est plausible avec les résultats de l'expérience mais n'est pas la seule possibilité existante

NB : Dans cet exemple, on **DÉMONTRE** que la *protéine GFP-X est membranaire*, mais on ne peut que **SUGGÉRER** que la *protéine X soit membranaire*, en effet rien ne nous prouve que la greffe du fluorochrome n'ait pas modifié les propriétés de la protéine X (notamment sa localisation cellulaire)

ATTENTION QCM : « L'expérience démontre que la protéine X est une protéine à localisation membranaire »
=> **FAUX !!** Elle le suggère



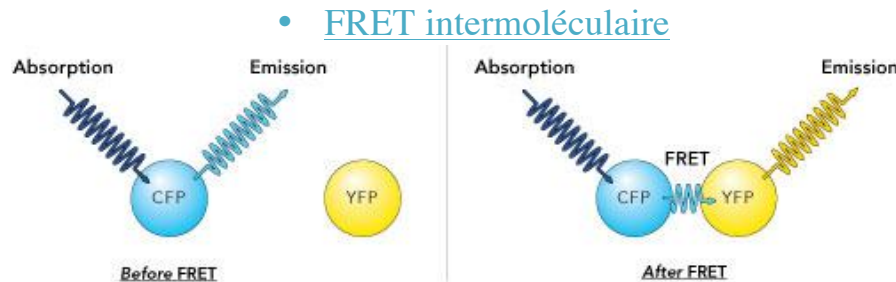
3. Applications de la fluorescence

❖ FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert)

Le FRET est une technique permettant l'étude des interactions moléculaires via un transfert d'énergie non radiatif (= sans émission de lumière) d'une molécule à une autre.

On greffe des fluorochromes aux molécules que l'on souhaite étudier, mais pour que le mécanisme ait lieu, il faut :

- ✓ Que le spectre d'émission de fluorescence du **donneur** recouvre le spectre d'excitation de fluorescence de l'**accepteur**
- ✓ Que les 2 molécules soient proches, distantes de **moins de 10nm**
 - ⇒ La détection d'un signal fluorescent est en faveur d'une forte proximité voire d'une association des 2 protéines que l'on veut étudier



La **CFP** absorbe dans le **bleu foncé** et émet dans le **cyan**, le **YFP** absorbe dans le **cyan** et émet dans le **jaune**.

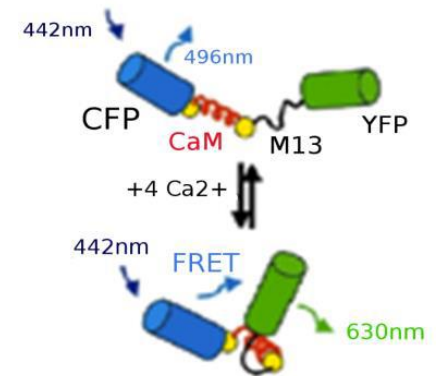
Si on observe au microscope une fluorescence cyan, cela indique les protéines greffées aux **CFP** et **YFP** ne sont pas en interaction (donc distant de plus de 10nm) mais si l'on observe une fluorescence jaune, cela indiquera une interaction moléculaire

- FRET intramoléculaire

Basé sur le même principe que le FRET intermoléculaire mais permet d'étudier la conformation moléculaire.

Dans cet exemple on retrouve la sonde calcique « caméléon » (= **calmoduline**) qui permet de mesurer la concentration calcique intracellulaire en calcium, cette protéine est ubiquitaire (= présente dans toutes les cellules).

La calmoduline en fixant du calcium change de conformation spatiale et rapproche ses 2 extrémités, donc si l'on observe un phénomène de FRET, la fluorescence sera proportionnelle à la quantité de calcium présent dans la cellule



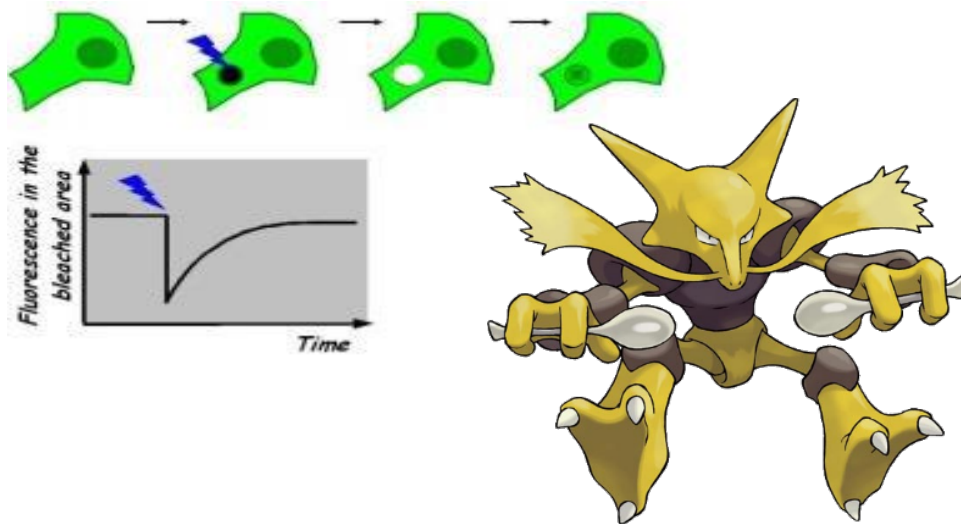
- ❖ FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Le FRAP et le FLIP (voir plus bas) sont des techniques basées sur le photoblanchiment (= photobleaching), on « tue » la fluorescence et cela de manière irréversible grâce à une forte intensité de lumière

Dans le FRAP on va irradier en un point précis jusqu'à perdre la fluorescence en ce point, on va ensuite observer

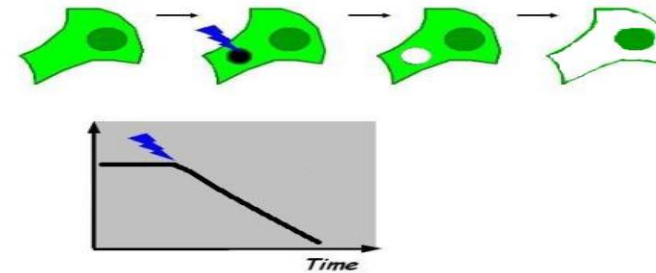
le retour de la fluorescence dans la zone irradiée par une étude dynamique des molécules fluorescentes provenant d'un autre continent cellulaire

ATTENTION : La fluorescence revient par déplacement des autres molécules fluorescentes présentes dans la cellule, elle ne « réapparaît » pas, le photoblanchiment est irréversible



❖ FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching)

C'est toujours le même principe mais cette fois on irradie une zone en continue et on en observe une autre, on mesure ainsi la vitesse de déplacement des molécules fluorescentes en observant la perte de fluorescence



❖ La Fluorescence induite

On utilise des colorants qui ne deviennent fluorescents que lorsqu'ils sont fixés à la molécule étudiée, utilisés essentiellement dans l'étude des acides nucléiques (ADN, ARN), le colorant va venir se fixer spécifiquement sur des paires de bases

On distingue 2 types de colorants :

- Hoechst et Dapi : colorant se fixant spécifiquement sur les bases A-T
- Intercalants : viennent se fixer entre les brins d'ADN de manière non spécifique (*Iodure de Propidium* et *Bromure d'Éthidium*)

Ces colorants permettent d'étudier l'hétérochromatine (= ADN très condensé) qui prendra une coloration intense et l'euchromatine (= ADN peu condensé) qui prendra une coloration plus faible

NB : Lorsque l'on colore l'ADN dans une cellule on se rend compte qu'il existe des zones non colorées dans le noyau, il s'agit des nucléoles qui ne contiennent que très

❖ L'immunofluorescence indirecte

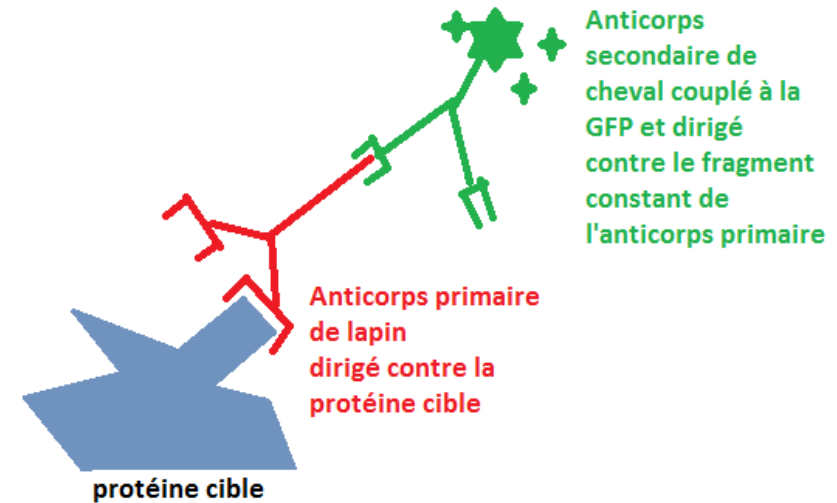
Technique immunochimique utilisant des anticorps couplés à un fluorochrome, on utilise le terme « indirect » car les molécules n'ont pas de propriétés de fluorescence propres, elles sont détectées par des anticorps qui eux vont être couplés à un fluorochrome.

NB : cette technique peut se pratiquer sur des cellules, des tissus vivants ou fixés

La protéine joue le rôle d'antigène, sur celle-ci on va retrouver plusieurs épitopes (= zones de reconnaissance des anticorps), pour plus de précision on utilisera des anticorps monoclonaux (voir fiche sur l'obtention d'anticorps monoclonaux)

Pour la technique d'immunofluorescence indirecte, on a besoin de 2 types d'anticorps

- Les anticorps primaires, dirigés contre la protéine d'intérêt, ne porte pas de fluorescence
- Les anticorps secondaires, dirigés contre les anticorps primaires, ceux sont eux qui sont couplés à des fluorochromes



QCM : Choisir le bon anticorps et le bon fluorochrome associé

L'anticorps secondaire doit **obligatoirement** provenir d'une autre espèce que celle de l'anticorps primaire

Pour visualiser et distinguer 2 protéines différentes il faudra que les fluorochromes greffés sur les anticorps secondaires émettent des couleurs différentes

Exemple : On souhaite étudier la localisation d'une protéine X ainsi que celle d'une protéine Y. On utilise la microscopie à fluorescence en couplant des anticorps primaires de Canaricho contre la protéine X et des anticorps primaires de Smogo contre la protéine Y. Avec l'utilisation d'anticorps secondaires, comment fait-on pour visualiser séparément ces protéines ?

A) Anticorps de Canaricho anti-immunoglobuline

de Papillusion couplés à la fluorescéine et anticorps de Smogo anti-immunoglobuline de Smogo couplé à la rhodamine

B) Anticorps de Arbo anti-immunoglobuline de Smogo couplés à la GFP et anticorps de Papillusion anti-immunoglobuline de Canarticho couplé à la fluorescéine

C) Anticorps de Pikachu anti-immunoglobuline de Canarticho couplés à la GFP et anticorps de Rattata anti-immunoglobuline de Smogo couplé à la rhodamine

D) Anticorps de Canarticho anti-immunoglobuline de Smogo couplés à la fluorescéine et anticorps de Smogo anti-immunoglobuline de Canarticho couplé à la rhodamine

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.

Réponse : C

❖ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

Le FISH est une technique d'hybridation in situ d'acides nucléiques (ADN, ARN) avec des sondes fluorescentes spécifiques (= complémentaires) soit des certains gènes, soit de chromosomes

Principe :

- Par un traitement chimique ou thermique, on dénature les liaisons hydrogènes qui unissent les 2

brins d'ADN

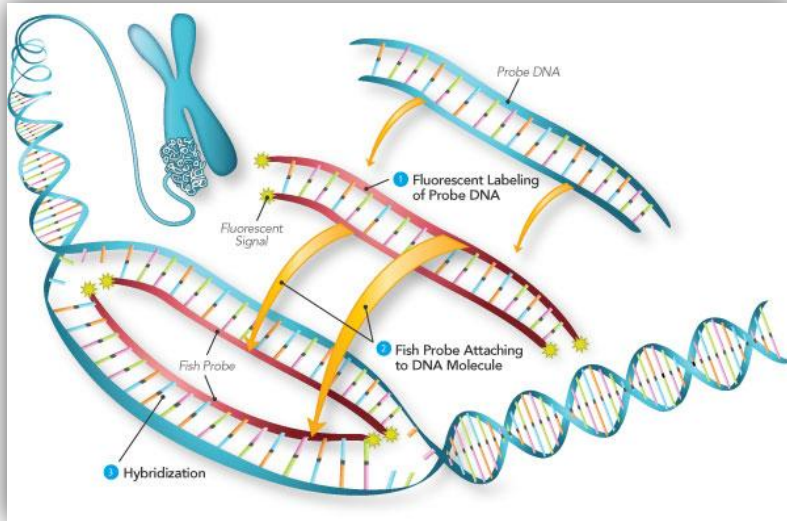
- On rajoute la sonde fluorescente à cet ADN dénaturé qui vient former un hybride spécifique avec l'ADN simple brin
- La sonde est marquée directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes permettant une visualisation en fluorescence.

NB 1 : Plus la sonde est longue, plus elle sera spécifique d'un gène donné

NB 2 : La technique du FISH tue la cellule car on dénature l'ADN

La technique du FISH permet également de trouver la localisation des ARNm dans les cellules en les hybridant avec une sonde fluorescente, mais ne nécessite pas d'étape de dénaturation car l'ARNm est déjà simple brin





✓ Déshydraté avec des bains d'alcool

NB 1 : En déshydratant les cellules on se prive d'informations concernant la présence d'eau dans un échantillon normal

NB 2 : L'étape de déshydratation est capitale car l'observation en microscopie électronique se fait sous vide

- ✓ Inclus dans une résine en Epoxy
- ✓ Coupes ultrafines grâce à un ultramicrotome
- ✓ Utilisation d'agents de contraste (sels de métaux lourds)

NB : les sels de métaux lourds sont denses aux électrons permettant de colorer et d'augmenter le contraste des échantillons

III. La microscopie électronique

Résolution : entre 200nm et 0,2nm

➤ Permet d'observer les organelles et les molécules

La microscopie électronique va utiliser un faisceau d'électrons (\neq photons), les échantillons observés subissent des préparations spéciales car les électrons possèdent un pouvoir pénétrant inférieur à celui des protons

Préparation de l'échantillon :

- ✓ Fixé via des traitements de fixation (fixent toutes les interactions moléculaires)

Rappel : Les cellules sont **fixées**, elles sont donc **mortes**

A. La microscopie électronique à transmission (MET)

On utilise un faisceau d'électrons que l'on a accéléré en le soumettant à une différence de potentiel de plusieurs kV

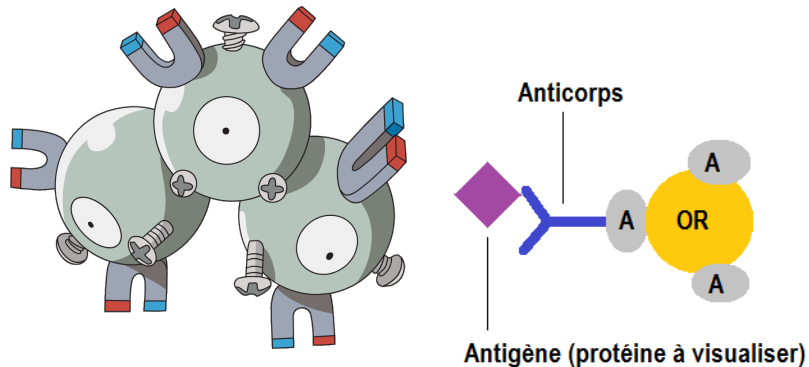
L'énorme avantage de la MET est qu'elle permet de très bien visualiser les contours de la cellule et des organites

NB : Plus une structure cellulaire est dense aux électrons plus elle apparaîtra foncée

Il existe plusieurs techniques spécialisées de MET

1. Le marquage à l'or (= immuno-gold)

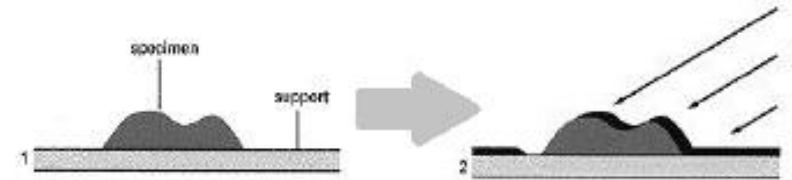
Cette technique permet d'identifier une protéine d'intérêt, l'or ne laissant pas passer les électrons, la protéine qui sera fixée à l'or apparaîtra foncée ou noire
Principe : On utilise des anticorps dirigés contre les antigènes de la protéine d'intérêt, accroché à cet anticorps va être fixée une molécule d'or colloïdale grâce à une protéine de type A ou G (proviennent de streptocoques ou de staphylocoques) qui a la capacité de se fixer sur tous les anticorps



NB : Ces anticorps fixés à de l'or sont achetés auprès de firmes spécialisées (pas la peine de se taper tout le montage soit même *Hallelujah*)

2. L'ombrage

Technique de visualisation indirecte de l'échantillon permettant d'en étudier la surface
Sous vide l'échantillon est bombardé de métaux lourds créant une réplique en métal de l'échantillon, celui-ci est ensuite dissout dans l'acide et on n'observe plus que la réplique avec notre faisceau d'électrons



3. Cryomicroscopie

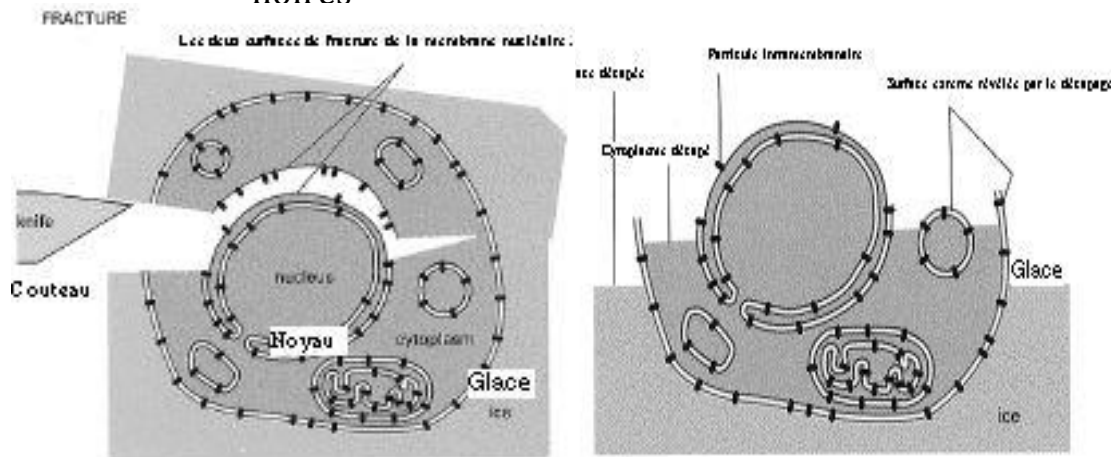
Technique permettant d'éviter la fixation et de limiter les risques de dénaturation.

Principe :

- Congélation ultra-rapide dans de l'azote liquide pour durcir l'échantillon et préserver l'organisation interne
- Fracturation de l'échantillon sous vide à l'aide d'un couteau créant une zone de fracture dans

les zones de moindres résistances
(préférentiellement au niveau de la zone
hydrophobe de la couche lipidique)

- Décapage par sublimation de la couche superficielle de glace dans le but d'augmenter les reliefs
- Vaporisation d'une fine couche de platine et de carbone pour solidifier et former un moule de la surface augmentant le contraste et la résistance mécanique
- Dissolution des tissus et observation de la réplique, les zones riches en platine apparaîtront noires



B. La microscopie électronique à balayage (MEB)

L'échantillon analysé est balayé par un faisceau d'électrons qui ne pénètre pas mais va seulement en exciter

la surface et émettre des électrons secondaires qui seront recueillis par un détecteur

NB 1 : la résolution de la MEB est de 10nm, elle est donc **plus faible** que celle de la MET

NB 2 : Le faisceau d'électron est réfléchi par l'échantillon

IV. La microscopie à force atomique

Appelée aussi microscopie en champ proche, permet d'observer une image directe à l'échelle atomique

Basée sur l'interaction entre les forces d'attractions et de répulsion des atomes avec un jeu de force entre les atomes de la pointe du microscope et les atomes de la surface de l'échantillon

NB : pour qu'il y ait mécanisme de force, il faut que la pointe du microscope et l'échantillon soient très proches, de l'ordre de quelques Ångström (10^{-10})

IMPORTANT : Plus la pointe du microscope sera fine, meilleure sera la résolution

IMPORTANT : Les seuls cas où l'on pourra observer des cellules vivantes sont :

- ✓ La microscopie à contraste de phase
- ✓ La microscopie optique confocale
- ✓ La microscopie à force atomique

IMPORTANT : Les anticorps ne détectent que les éléments de nature protéique, il n'existe donc pas d'anticorps anti-ADN !

